

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Luiza Paul Géa

**INTEGRANDO AS HIPÓTESES INFLAMATÓRIA E NEUOTRÓFICA NA
FISIOPATOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR: FOCO NAS ALTERAÇÕES
PERIFÉRICO-CENTRAIS E PERSPECTIVAS DE NOVOS ALVOS
TERAPÊUTICOS**

Porto Alegre

2019

Luiza Paul Géa

**INTEGRANDO AS HIPÓTESES INFLAMATÓRIA E NEUOTRÓFICA NA
FISIOPATOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR: FOCO NAS ALTERAÇÕES
PERIFÉRICO-CENTRAIS E PERSPECTIVAS DE NOVOS ALVOS
TERAPÊUTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Ribeiro Rosa

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Géa, Luiza Paul

Integrando as Hipóteses Inflamatória e Neurotrófica na Fisiopatologia dos Transtornos de Humor: Foco nas Alterações Periférico-Centraís e Perspectivas de Novos Alvos Terapêuticos / Luiza Paul Géa. -- 2019.

167 f.

Orientadora: Adriane Ribeiro Rosa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Inflamação. 2. Transtornos de humor. 3. Modelos animais. 4. Exendina-4. I. Rosa, Adriane Ribeiro, orient. II. Título.

Luiza Paul Géa

**INTEGRANDO AS HIPÓTESES INFLAMATÓRIA E NEUOTRÓFICA NA
FISIOPATOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR: FOCO NAS ALTERAÇÕES
PERIFÉRICO-CENTRAIS E PERSPECTIVAS DE NOVOS ALVOS
TERAPÊUTICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutora.

Aprovado em 03 de maio de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirian Salvador – Universidade de Caxias do Sul (UCS)

Profa. Dra. Carmem Gottfried – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Iraci Torres – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

*Inquestionavelmente,
àqueles que fizeram de mim o que eu sou hoje,
mãe e pai.*

AGRADECIMENTOS

Uma das coisas que aprendi ao longo destes quatro anos é que ninguém trabalha ou alcança seus objetivos sozinho e que o trabalho em grupo está fadado ao sucesso.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Adriane (Adri) Rosa, pela confiança de me aceitar como aluna de doutorado. Ainda, agradeço ao apoio incondicional, disponibilidade e atenção ao longo do desenvolvimento de todo o trabalho. Sou grata também a todas as oportunidades que ela me proporcionou e tenho muito orgulho (desde o primeiro contato) de ter sido orientada e ter tido a honra de trabalhar com uma pesquisadora excelente e representante atuante das “Mulheres na Ciência”!

Agradeço ao Laboratório de Psiquiatria Molecular pela acolhida desde o primeiro dia. Meu crescimento pessoal e acadêmico reflete todo o auxílio e suporte de todos! Incluindo os melhores ICs – como Barbarela, Eriqueta, Lari, Gabi Hizo e Gabi Schmidt –, excelentes colegas e amigos de pós e professores. Ainda, um agradecimento especial àqueles com os quais o “sofrimento” e os melhores momentos de descontração foram divididos Dudinha (meu braço direito e esquerdo), Pam, Gabi Berni, Thaisete e Dieguito!

Agradecimentos mais do que merecidos à toda equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA – Marta, Rosa, Dani, Vera, Ana e Tuane – que possibilitam a realização de pesquisa de alto nível devido ao cuidado e cumprimento com padrões éticos necessários para a pesquisa com animais.

Durante esta jornada, um ano de experiência no exterior me proporcionou a ida a um dos melhores países para se viver, o Canadá. Assim, agradeço pela oportunidade concedida a mim pelo Dr. Benicio Frey. Esta experiência ainda permitiu reencontrar e conhecer novos amigos que também contribuíram diretamente neste trabalho e no meu crescimento. Portanto, muito obrigada Bi Aguiar, Bi Pfaffen, Tai, Devon e professor Flavio Kapczinski! Sem esquecer das novas amizades com gringos e brasileiros que fizeram desta experiência mais do que especial.

Agradeço ao suporte de professores, funcionários, colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica. Sucesso e prosperidade a todos!

À CAPES e ao CNPq pelos auxílios financeiros nacional e internacional.

Os meus mais sinceros sentimentos de gratidão aos meus pais, Liana e Cezar, que sempre me proporcionaram um ambiente familiar repleto de carinho e amor, e acesso a melhor educação possível o que definitivamente permitiu que eu chegasse até aqui. Amo vocês! Ainda,

obrigada pelo suporte e apoio de todas as minhas escolhas (daquelas sábias, pelo menos). Vocês sempre foram e são os meus maiores exemplos!

Ao meu noivo, Lucas, agradeço pelo suporte emocional e logístico – que incluiu caronas a qualquer hora para cuidar dos ratinhos –, pela companhia nos momentos difíceis e por todos os momentos felizes que passamos juntos antes e durante este trabalho, e aos que virão na próxima etapa. Te amo!

*“The advantage of the emotions is
that they lead us astray,
and the advantage of science is
that it is not emotional”*

Oscar Wilde

RESUMO

Os transtornos de humor são doenças mentais graves, recorrentes e complexas, com alta prevalência na população mundial e caracterizados por alterações de humor. Entre os mais prevalentes estão o transtorno depressivo maior (TDM) e o transtorno bipolar (TB). Sem uma única causa definida, as alterações genéticas e de resposta ao estresse são fatores etiológicos relacionados ao aparecimento dos sintomas de humor, contribuindo significativamente para a suscetibilidade a outros fatores fisiopatológicos. Estudos mais recentes têm integrado as hipóteses inflamatória e neurotrófica à teoria monoaminérgica, a fim de propor uma nova abordagem para o entendimento da fisiopatologia e resposta ao tratamento nos TDM e TB. Portanto, a utilização e validação de modelos animais que mimetizem as manifestações clínicas são essenciais para o progresso da pesquisa acerca dos transtornos de humor. Este trabalho teve por objetivo utilizar diferentes modelos animais para avaliar a relação das alterações periféricas de parâmetros inflamatórios, neurotrófico e de estresse oxidativo com desfechos em nível central. Ainda, investigar o potencial efeito neuroprotetor da exendina-4 (EX-4), um agonista do receptor de peptídeo semelhante ao glucagon 1, comumente utilizado para o controle glicêmico. No modelo animal de administração de lipopolissacarídeo (LPS) seguida de exposição a estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS), os animais CUMS+ apresentaram uma redução do ganho de peso corporal, dos níveis séricos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e do consumo e preferência a sacarose, bem como um aumento no peso da glândula adrenal e da atividade exploratória no campo aberto – incluindo o tempo de permanência na periferia considerado um comportamento tipo-ansioso. Ainda, os animais dos grupos LPS apresentaram uma hipertrofia do baço. Porém, apenas no grupo do protocolo combinado (LPS/CUMS+) foi observado um aumento dos níveis séricos de interferon (IFN) γ que se correlacionou de forma moderada à redução do consumo de sacarose, um comportamento tipo-anedônico clássico. Esta é uma importante evidência que corrobora o papel da inflamação no surgimento dos sintomas depressivos como observado em indivíduos com transtornos de humor. No modelo de mania induzido por anfetamina (AMPH), buscou-se identificar uma possível alteração de permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), mecanismo fisiopatológico proposto recentemente nos transtornos de humor, bem como o efeito do tratamento com lítio. Conforme esperado, os animais que receberam administração de AMPH apresentaram aumento da atividade exploratória no campo aberto. Por sua vez, níveis séricos aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram observados nos animais tratados com lítio. Embora não tenha sido observada alteração dos níveis centrais de fator de necrose tumoral (TNF) α e da expressão de claudina-5, uma das proteínas importantes para manutenção da integridade da BHE, a investigação deste parâmetro deve ser introduzida na pesquisa pré-clínica. Por fim, em um modelo agudo de inflamação induzida por LPS, foi observado um significativo efeito anti-inflamatório do tratamento com a maior dose de EX-4 proposta (0,5 μ g/kg). Porém, não foram observados efeitos no comportamento e nos níveis séricos e hipocâmpais de BDNF e TBARS. Assim, a utilização de modelos animais permite explorar a relação das alterações periféricas e centrais, o que muitas vezes não é possível na clínica. Além disso, é possível utilizá-los para avaliação do redirecionamento de

fármacos, com potencial ação neuroprotetora, que possam ser capazes de auxiliar no tratamento dos transtornos de humor, melhorando a resposta terapêutica.

Palavras-chave: Inflamação, Neurotrofinas, Estresse oxidativo, Barreira hematoencefálica, Transtornos de humor, Transtorno depressivo maior, Transtorno bipolar, Modelos animais, Exendina-4.

ABSTRACT

Mood disorders are severe, recurrent and multifactorial mental illnesses, characterized by changes in the mood and high prevalence rates in the general population. The most prevalent are Major depressive disorder (MDD) and Bipolar disorder (BD). Without a specific etiology, genetic variations and stress response are known to be important triggers of the mood symptoms increasing the susceptibility to other pathophysiological factors. Recent evidence had been integrating inflammatory and neurotrophic hypothesis to the monoaminergic theory, proposing a new perspective to elucidate the physiopathology and treatment response in MDD and BD. Thus, the use and validation of animal models that mimic clinical symptoms are essential to develop research regarding mood disorders further. The aim of this work was to employ different animal models to evaluate the relationship between peripheral changes on inflammatory, neurotrophic and oxidative stress parameters and central outcomes. In addition, the neuroprotective potential of exendin-4 (EX-4) treatment, an agonist of the glucagon-like receptor 1 (GLP-1r), commonly used in glycemic control. In the model of lipopolysaccharide (LPS) injection associated with chronic unpredictable mild stress (CUMS) exposure, CUMS+ animals exhibited reduced gain of body weight, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) serum levels and sucrose consumption and preference, as well as increased adrenal gland weight and exploratory activity in the open field – including time spent in the periphery indicating an anxiety-like behavior. Also, LPS animals presented with splenic hypertrophy. Interestingly, animals submitted to the combined protocol (LPS/CUMS+) displayed increased serum levels of interferon (IFN) γ which were further correlated with reduced sucrose consumption, a classical anhedonic-like behavior. This is a relevant finding that corroborates the implication of inflammation on the development of depressive symptoms commonly observed in patients. In the animal model of mania induced by amphetamine (AMPH), we aimed to evaluate its effect on blood-brain barrier (BBB) disruption, which has been proposed as a new mechanism in the pathophysiology of mood disorders, as well as the effect of lithium treatment. As expected, AMPH-injected animals exhibited an increase in the exploratory behavior in the open field. Also, increased serum levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were observed in the animals treated with lithium. Although no changes were observed in the central levels of tumor necrosis factor (TNF) α and protein levels of claudin-5, a protein involved in the maintenance of the integrity of the blood-brain, the evaluation of similar parameters should be performed in preclinical research. Lastly, in the animal model of acute inflammation induced by LPS, we observed a significant anti-inflammatory effect of the higher dose of EX-4 evaluated (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). However, no other effects of EX-4 were observed in the behavior and in the serum and hippocampal levels of BDNF and TBARS. Thus, animal models facilitate the investigation of peripheral and central changes, which is not always possible in the clinical setting. Besides, it is possible to use them to evaluate drug repurposing of compounds with neuroprotective potential that can improve the treatment responsiveness in mood disorders.

Keywords: Inflammation, Neurotrophins, Oxidative stress, Blood-brain barrier, Mood disorders, Major depressive disorder, Bipolar disorder, Animal models, Exendin-4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação da ativação do eixo HPA e da inflamação na resposta ao estresse.	29
Figura 2. O envolvimento da via das quinureninas no metabolismo de neurotransmissores..	32
Figura 3. Vias envolvidas na comunicação entre inflamação periférica e central.	37
Figura 4. Efeitos centrais das citocinas inflamatórias no metabolismo de neurotransmissores e na neuroplasticidade.	39
Figura 5. Efeito da inflamação na modulação de mecanismos de neuroplasticidade dependentes de BDNF.....	42
Figura 6. EROs/ERNs como promotores e produtos da inflamação.....	45
Figura 7. Mecanismos de interação da inflamação periférica com a BHE e efeitos centrais..	48
Figura 8. Resumo dos achados encontrados nos modelos animais utilizados.....	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Validades e aplicabilidade de modelos animais de transtornos de humor.....	49
Tabela 2. Efeito da administração aguda de LPS (24 h) em parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo em roedores.	51
Tabela 3. Efeito do estresse crônico em parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo em roedores.	55
Tabela 4. Efeito de diferentes psicoestimulantes em marcadores inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo em roedores.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMPH	Anfetamina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BEC	Células endoteliais dos capilares cerebrais
BHE	Barreira hematoencefálica
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPC
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DA	Dopamina
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DPP-4	Dipeptidil peptidase 4
DSM-5	Manual Estatístico Diagnóstico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria - 5ª edição
<i>e.g.</i>	Por exemplo (do latim, <i>exempli gratia</i>)
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EX-4	Exendina-4 ou exenatida
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLP-1r	Receptor de GLP-1
GR	Receptores de glicocorticoides
HPA	(Eixo) Hipotálamo-hipófise-adrenal
<i>i.e.</i>	Isto é (do latim, <i>id est</i>)
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

KAT	Quinurenina aminotransferase
KMO	Quinurenina 3-mono-oxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAOA	Monoaminoxidase A
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MDA	Malondialdeído
NA	Noradrenalina
NFκB	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor do tipo NOD
NMDAr	Receptores N-metil-D-aspartato
NT-3	Neurotrofina 3
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Proteína C reativa
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PK	Proteína quinase
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
STI	Índice de toxicidade sistêmica
TB	Transtorno bipolar
TDM	Transtorno depressivo maior
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
tpA	Enzima ativadora tecidual do plasminogênio
TrkB	Receptores tirosina (ou tropomionsina) quinase B

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	25
1.1 TRANSTORNOS DE HUMOR.....	25
1.2 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR.....	27
1.2.1 Vulnerabilidade genética e estresse: importantes fatores de risco.....	27
1.2.2 Neurotransmissores: além da hipótese monoaminérgica.....	30
1.2.3 Sistema imune e inflamação.....	34
1.2.4 Neurotrofinas: o papel do BDNF.....	40
1.2.5 Estresse oxidativo: ativador e amplificador da resposta imune.....	43
1.3 BHE: POSSÍVEL MEDIADORA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICO-CENTRAIS	46
1.4 MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS DE HUMOR	48
1.4.1 Modelo de inflamação aguda induzido por LPS	50
1.4.2 Modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS)	52
1.4.3 Modelo de hiperatividade induzida por anfetamina (AMPH).....	54
1.5 PERSPECTIVA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS.....	58
1.5.1 Agonistas do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1)	58
2 OBJETIVOS	63
2.1 OBJETIVO GERAL.....	63
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
3 ARTIGO CIENTÍFICO I	65
4 ARTIGO CIENTÍFICO II.....	97
5 ARTIGO CIENTÍFICO III	117
6 DISCUSSÃO	145
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	153
REFERÊNCIAS	155
ANEXO A – OUTRAS PUBLICAÇÕES	183

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 TRANSTORNOS DE HUMOR

Os transtornos de humor são doenças mentais graves, recorrentes e complexas, com alta prevalência na população mundial, e que afetam primariamente o estado emocional ou humor do indivíduo – sendo os mais comuns o transtorno depressivo maior (TDM) e o transtorno bipolar (TB) (WITTCHEN, 2012). Segundo o *National Institute of Mental Health*, cerca de 21,4% dos indivíduos adultos apresentam algum episódio depressivo ao longo da vida, sendo a prevalência estimada em 9,7% (NIMH, 2017a). Atualmente, os transtornos de humor são considerados um espectro de doenças do sistema nervoso central (SNC) associados a múltiplas etiologias (RUIZ et al., 2018). Sem uma única causa definida, múltiplos fatores que contribuem para o desenvolvimento dos transtornos de humor já foram descritos, bem como predisposição genética e fatores ambientais (AUDET et al., 2014; BAO; SWAAB, 2019; LAU; ELEY, 2010; PISHVA; RUTTEN; VAN DEN HOVE, 2017).

O TDM, também conhecido como depressão unipolar, é um dos transtornos de humor mais prevalente, afetando cerca de 4,4% de indivíduos adultos na população mundial – e 5,8% no Brasil –, sendo mais frequente em mulheres do que homens em uma razão de 2:1 (WHO, 2017a). Em 2017, o TDM foi destaque da campanha da Organização Mundial de Saúde, a qual projetou que em 2030 o mesmo será a condição mais prevalente no mundo (WHO, 2011, 2017b). Segundo o Manual Estatístico Diagnóstico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria - 5ª edição (DSM-5), o TDM é caracterizada clinicamente como um transtorno heterogêneo, que frequentemente se manifesta com sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Indivíduos com TDM apresentam um declínio do humor clinicamente significativo associado a um comprometimento da funcionalidade. A depressão ou episódio depressivo maior é definido principalmente pela ocorrência de pelo menos duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse na maior parte das atividades, o que caracteriza a anedonia. Este sintoma quando acompanhado de pelo menos quatro sintomas adicionais de depressão – como sentimento de desesperança, desvalia, culpa, desamparo – e associado a outras alterações – como perda de apetite e sono, fadiga, retardo ou agitação psicomotora, diminuição do desempenho sexual, dificuldade de concentração e raciocínio e pensamentos recorrentes sobre a morte, permite o diagnóstico deste transtorno de humor.

O TB afeta cerca de 2,8% dos indivíduos adultos, ocorrendo em ambos os sexos na mesma proporção (NIMH, 2017b). Diferentemente do TDM, este transtorno é caracterizado por episódios recorrentes de mania ou hipomania e depressão, sendo classificado em TB tipo I e tipo II, respectivamente (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Em contraste ao episódio depressivo, a mania caracteriza-se por um período anormal de humor elevado e da energia dirigida a certos objetivos com duração mínima de uma semana. Ainda, esta alteração de humor deve estar acompanhada de pelo menos três outros sintomas como autoestima inflada, redução da necessidade de sono, pressão na fala e distratibilidade, além de estar associada à perda de funcionamento social e profissional. Na hipomania, estes sintomas também devem estar presentes, mas com uma duração mínima de quatro dias. Sendo assim, no TB tipo I, os indivíduos apresentam episódios depressivos maiores – como descrito no TDM – e pelo menos um episódio maníaco maior, enquanto que no TB tipo II são observados episódios depressivos maiores e episódios hipomaníacos. Ambos os tipos apresentam sintomas que envolvem alterações no humor, na cognição e no comportamento, sendo a intensidade dos sintomas variável e acarretando em prejuízos no desempenho das atividades diárias, além do sofrimento pessoal.

Conforme mencionado, indivíduos com transtornos de humor apresentam déficits cognitivos em distintos domínios neuropsicológicos como memória e aprendizado, memória de trabalho, função executiva, velocidade de processamento e atenção (PANCHAL; KALTENBOECK; HARMER, 2019). Estas alterações acontecem tanto durante os episódios agudos da doença, seja depressivo ou de mania, quanto durante a eutimia – estado caracterizado pela remissão dos sintomas (MARTINEZ-ARAN et al., 2007; PETERSEN; PORTER; MISKOWIAK, 2018; TORRENT et al., 2013). Consequentemente, déficits cognitivos têm sido consistentemente associados a um maior prejuízo psicossocial em áreas cruciais do cotidiano, como no trabalho e nas relações sociais, o que implica diretamente na autonomia e qualidade de vida dos pacientes (DOUGLAS et al., 2018; ROSA et al., 2012, 2014a).

Embora, os transtornos de humor possuam etiologia e fisiopatologia complexas, fatores pessoais e sociais influenciam consideravelmente no curso dessas doenças. A exposição a situações estressoras no início e durante a vida, por exemplo, é capaz de desencadear episódios depressivos, tanto em indivíduos com transtorno de humor quanto na população em geral, além de determinar a gravidade da doença (CRONKITE et al., 2013; PATTEN, 2013). Entretanto, há uma variabilidade interindividual na resposta ao estresse determinada por fatores ambientais – como a epigenética – que induz uma maior ou menor vulnerabilidade ao TDM e ainda pode

predizer a resposta ao tratamento (BAGOT et al., 2014; MENKE; BINDER, 2014). A manifestação de sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos dificulta o tratamento dos transtornos de humor que associada à baixa adesão ao mesmo predispõe os pacientes a um maior risco de recidivas (VIETA et al., 2013). Além dos sintomas já descritos, indivíduos com transtorno de humor desenvolvem comorbidades médicas. Estudos sobre o assunto relatam que mais da metade dos pacientes estão acima do peso ou obesos, e um terço sofre com a síndrome metabólica associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, derrame e diabetes mellitus do tipo II (KEMP et al., 2010).

Portanto, a compreensão do que já foi descrito até o momento e o desenvolvimento de novos estudos acerca da fisiopatologia dos transtornos de humor torna-se muito relevante para a área da Psiquiatria. Além disso, por serem caracterizados como heterogêneos, a busca por novos alvos terapêuticos que possibilitem um tratamento mais personalizado poderá contribuir com o aumento das taxas de remissão bem como reduzir o sofrimento do paciente e de seus familiares.

1.2 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE HUMOR

1.2.1 Vulnerabilidade genética e estresse: importantes fatores de risco

Muitos estudos de famílias e irmãos já demonstraram as influências genéticas e, principalmente, a suscetibilidade associada ao surgimento dos transtornos de humor. Aparentemente, o TB possui um caráter genético associado mais forte que o TDM. Dados mais recentes de coortes familiares estimam que a herdabilidade do TB seja de 58% e da DM 28-44% (FERNANDEZ-PUJALS et al., 2015; SONG et al., 2015). Entretanto, até o momento não foi identificado um único *locus* que indicasse risco para o desenvolvimento de transtornos de humor, mas vários já foram associados – o que indica uma heterogeneidade na etiologia desses transtornos (KERNER, 2015) – para uma revisão da literatura vide Craddock and Forty (2006). Devido à importância da hipótese monoaminérgica (discutida na seção 1.2.2) na fisiopatologia dos transtornos de humor, polimorfismos em enzimas responsáveis pela degradação de monoaminas (como a monoaminoxidase A, MAOA) e catecolaminas (como a catecol-O-metiltransferase, COMT), bem como no transporte de serotonina (como o transportador de serotonina, SERT) foram associados ao TB nas primeiras meta-análises acerca do assunto (CRADDOCK; FORTY, 2006; LAU; ELEY, 2010). No TDM, existem alguns genes candidatos

que também envolvem os transportadores de serotonina (genes 5HTT e HTR1A) e dopamina (genes SLC6A3 e DRD4), bem como outros que estão envolvidos com processos metabólicos (genes MTHFR, APOE e GNB3) (FLINT; KENDLER, 2014). Outro polimorfismo importante e frequentemente associado aos transtornos de humor é o Val66Met, um polimorfismo no gene que codifica o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) associado à dificuldade do processamento e transporte desta neurotrofina para locais de sinapse (LAU; ELEY, 2010). Indivíduos que possuem este polimorfismo parecem apresentar uma maior vulnerabilidade em desenvolver transtornos de humor, bem como exibem alterações cognitivas (HOSANG et al., 2014; LEE et al., 2016; POST, 2007). Assim, alterações genéticas *per se* contribuem para a suscetibilidade individual, mas são apenas um dos fatores etiológicos e fisiopatológicos dos transtornos de humor.

Associados à vulnerabilidade genética, eventos estressores ao longo da vida são importantes gatilhos no desenvolvimento dos transtornos de humor. Em um estudo com irmãos gêmeos, Kendler e cols. (2001) observaram que, independente do risco genético associado, eventos estressores ao longo da vida e episódios depressivos prévios são importantes preditores de risco para o TDM. Fisiologicamente, situações de estresse agudo promovem a liberação de adrenalina e noradrenalina (NA) de inervações do sistema nervoso simpático (SNS), bem como a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (LUCASSEN et al., 2014). Em relação ao eixo HPA, o hipotálamo é ativado produzindo o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) que exercerá sua função na hipófise liberando o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que, por sua vez, age na zona cortical da glândula adrenal promovendo a secreção do cortisol (e corticosterona em ratos). O cortisol age em receptores de glicocorticoides (GRs) presentes no SNC e na periferia e contribui para um importante mecanismo de autorregulação deste eixo.

Nos transtornos de humor, pacientes apresentam um desequilíbrio desta retroalimentação negativa do eixo HPA, o que caracteriza uma maior suscetibilidade ao estresse (FRIES et al., 2014; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Assim, indivíduos com TDM e TB apresentam hipercortisolemia, que também repercute negativamente na função cognitiva dos mesmos (FRIES et al., 2014; KELLER et al., 2017). Acredita-se que esta hiperatividade do eixo HPA esteja associada a alterações na função dos GRs como resultado de uma modulação bidirecional entre o sistema imune e o eixo HPA, detalhado na Figura 1 (FRIES et al., 2014; MILLER; PARIANTE; PEARCE, 1999; PARIANTE; MILLER, 2001). Inicialmente, o estresse psicossocial é capaz de ativar o sistema imune periférico e central por ação do SNS. Em um segundo momento, ocorre a ativação do eixo HPA e o cortisol secretado age nos GRs

periféricos, presentes em monócitos e macrófagos, exercendo um efeito anti-inflamatório (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Em condições de estresse crônico ou hiperatividade do eixo HPA, o sistema imune se torna resistente a ação dos glicocorticoides. Nas células imunes, a ativação de vias inflamatórias – principalmente a do fator nuclear kappa B (NFκB) – gera uma alteração na translocação dos GRs do citoplasma para o núcleo, bem como diminui a expressão da forma ativa do receptor (PACE; HU; MILLER, 2007). Portanto, a ativação crônica desta circuitaria é que promove efeitos deletérios, como alterações no metabolismo de neurotransmissores (incluindo monoaminas e glutamato), na secreção de neurotrofinas e na função do sistema imune (BAO; SWAAB, 2019).

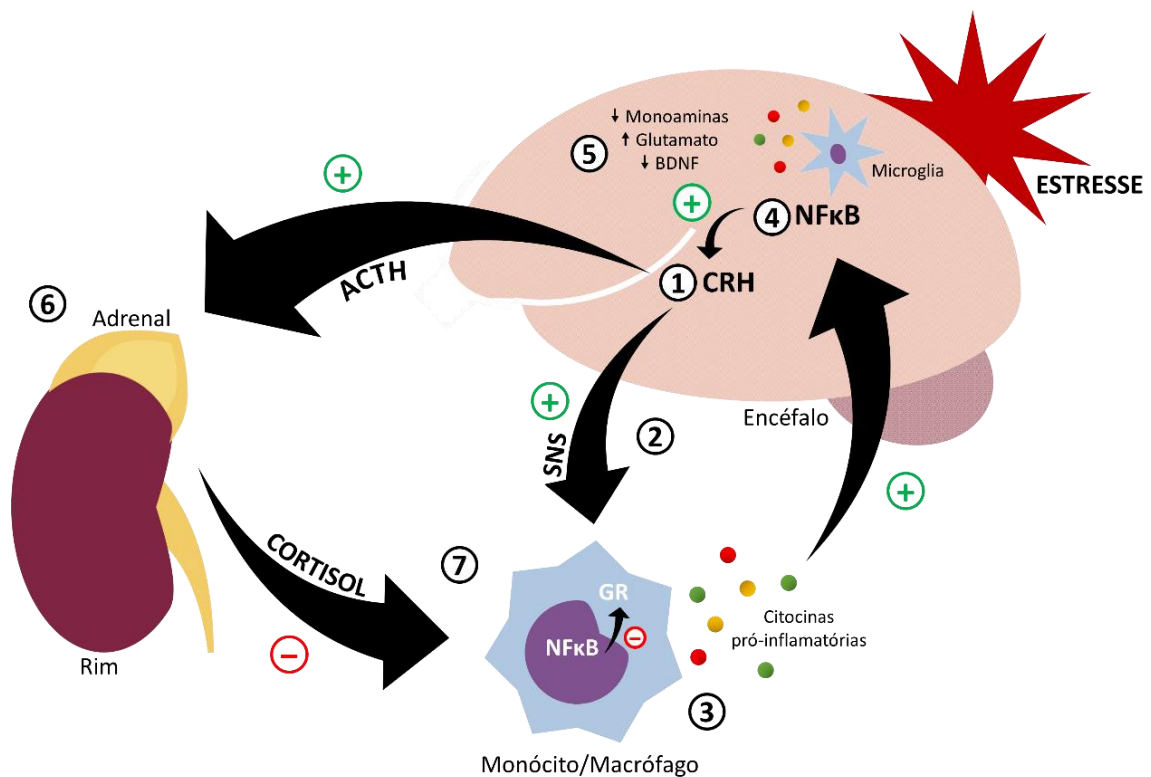


Figura 1. Relação da ativação do eixo HPA e da inflamação na resposta ao estresse. Condições estressoras (*i.e.*, estresse psicossocial) ativam o eixo HPA (1). As catecolaminas secretadas pelas terminações nervosas simpáticas acabam por ativar células do sistema imune (2), favorecendo o deslocamento de NFκB para o núcleo e a liberação de citocinas inflamatórias (3). No SNC, as citocinas pró-inflamatórias também ativam o NFκB (4), contribuindo para a redução da produção de neurotrofinas (*e.g.*, BDNF) e a alteração do metabolismo monoaminérgico e glutamatérgico (5). O CRH também estimula a secreção de ACTH, que por sua vez promove a liberação de cortisol (6). No estresse agudo, a liberação de cortisol tem um efeito anti-inflamatório potente (7). Porém, em condições de estresse crônico, as citocinas inflamatórias produzidas diminuem a translocação e expressão de GR (7). Fonte: modificado de Miller; Maletic; Raison (2009).

Assim, as alterações genéticas e de resposta ao estresse são fatores importantes no aparecimento de sintomas de humor, contribuindo significativamente para a suscetibilidade a outros fatores fisiopatológicos (ANISMAN, 2009). Além das alterações dos níveis de monoaminas, vem sendo associados aos transtornos de humor um aumento de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo com redução das concentrações de neurotrofinas. Portanto, as alterações periféricas e centrais associadas contribuem para o entendimento de que os transtornos de humor são atualmente considerados doenças multissistêmicas. A importância e a relação destes processos com as alterações de neurotransmissores e a interrelação entre os mesmos serão discutidas nas próximas seções.

1.2.2 Neurotransmissores: além da hipótese monoaminérgica

Desde a metade do século XX, a hipótese monoaminérgica é a mais aceita e uma das principais explicações para as bases neurobiológicas dos transtornos de humor (LIU; ZHAO; GUO, 2018). Logo, as alterações de humor, principalmente episódios depressivos, tem por causa a redução dos níveis centrais de monoaminas, serotonina (5-HT), dopamina (DA) e NA – inicialmente proposto por Heninger et al., (1996) –, sendo um dos principais alvos das terapias antidepressivas atuais a modulação destes neurotransmissores, que se dá principalmente pela inibição da recaptação ou inibição do metabolismo das monoaminas. Resultados de estudos *post mortem* e de neuroimagem indicam que a menor disponibilidade das monoaminas ainda pode ser resultado de uma diminuição da função dos transportadores, bem como da sensibilidade dos receptores, da redução de vesículas sinápticas ou da remoção das mesmas na vesícula sináptica por ação da MAO (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018; KAMBEITZ; HOWES, 2015; MEYER, 2017; RUIZ et al., 2018).

A 5-HT é produzida por neurônios localizados no núcleo da rafe no tronco encefálico, que enviam projeções serotoninérgicas para regiões corticais envolvidas com diferentes comportamentos, como cognição, humor, apetite e sono (YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017). Apesar de seu papel importante como neurotransmissor, apenas 10% de 5-HT é produzido no núcleo da rafe, sendo o restante de origem periférica, especificamente de células enteroendócrinas (MARTIN et al., 2017). No SNC, além dos neurônios, os astrócitos e a microglia também expressam receptores serotoninérgicos. Existem diferentes subtipos de receptores de 5-HT que na sua maioria são acoplados à proteína G (MARTINOWICH; LU,

2008). Além da possibilidade de ligar-se a receptores pré- e pós-sinápticos, a 5-HT liberada na fenda sináptica ainda pode ser recaptada pelos seus transportadores – SERT, que são alvos da terapia antidepressiva – resultando em uma modulação da duração do efeito deste neurotransmissor (KULIKOV et al., 2018). Ao inibir a recaptção de 5-HT pelos SERT, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), a primeira linha de tratamento do TDM, aumentam a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica que por sua vez é capaz de atuar em seus receptores aumentando a sinalização serotoninérgica (TACIAK; LYSENKO; MAZUREK, 2018). Porém, os efeitos antidepressivos no comportamento não são imediatos, levando semanas até serem observados, o que levou a hipóteses de que seja necessária uma reestruturação sináptica para que sua ação ocorra (KULIKOV et al., 2018). Logo, estudos já reportaram que o tratamento crônico com antidepressivos resulta em um aumento da neurogênese hipocampal, frente a ativação de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₄ locais, o que parece favorecer o efeito destes fármacos no comportamento (SEGI-NISHIDA, 2017). Este potencial neurotrófico da 5-HT está envolvido com a estimulação da produção de BDNF (MARTINOWICH; LU, 2008). De forma geral, após o bloqueio de SERT por ação dos antidepressivos, a 5-HT disponível atua em seus receptores (*e.g.*, 5-HT₄, 6 e 7) acoplados a adenilato ciclase e proteína quinase (PK) A, que por sua vez levam ao aumento da fosforilação da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) – sabidamente responsável pela regulação da transcrição de BDNF (KRAUS et al., 2017). Ainda, esta relação de modulação de plasticidade sináptica e transmissão serotoninérgica parece ocorrer em ambos os sentidos (vide seção 1.2.4).

Em condições fisiológicas, o sistema serotoninérgico utiliza triptofano, um aminoácido essencial, como principal metabólito para a síntese de 5-HT. Entretanto, elevados níveis de citocinas inflamatórias favorecem o aumento da expressão de SERT na microglia e astrócitos (DANTZER et al., 2008a). Consequentemente, a menor disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica acarreta em uma maior demanda neuronal de triptofano para a síntese (ANDERSON et al., 2016). Porém, o aumento de citocinas inflamatórias também acaba por realocar o triptofano para a via das quinureninas, resultando em uma redução da produção de 5-HT e no envolvimento desta via na fisiopatologia dos transtornos de humor (ARNONE et al., 2018; VANCASSEL; CAPURON; CASTANON, 2018) (Figura 2). A partir do triptofano, a indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), a enzima limitante da via, forma a quinurenina, a primeira molécula estável e a partir da qual outros dois compostos com ações opostas podem ser formados. Em mamíferos, as enzimas desta via estão preferencialmente em células não-

neuronal, ocorrendo principalmente nas células gliais (MADDISON; GIORGINI, 2015; SCHWARCZ et al., 2012). Assim, a microglia expressa a quinurenina 3-mono-oxigenase (KMO) sendo capazes de produzir ácido quinolínico, enquanto que a quinurenina aminotransferase (KAT) é observada nos astrócitos formando ácido quinurênico (SCHWARCZ et al., 2012).

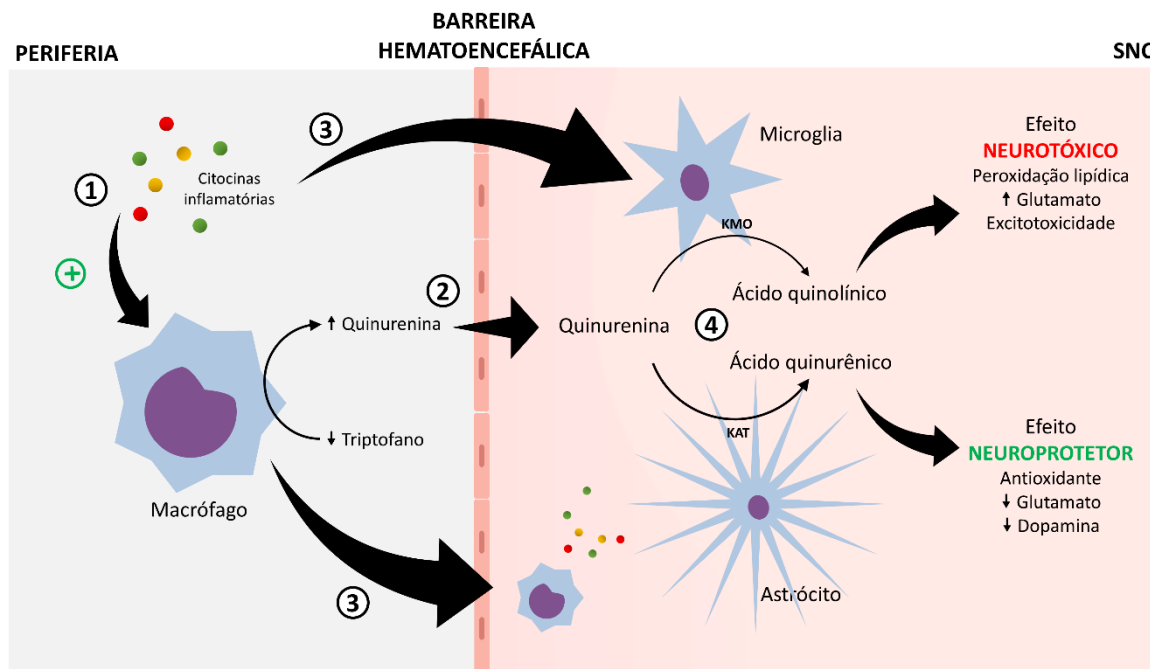


Figura 2. O envolvimento da via das quinureninas no metabolismo de neurotransmissores. Na periferia, altos níveis de citocinas inflamatórias ativam macrófagos aumentando a atividade da enzima IDO (1) e a formação de quinurenina (2), que resulta em uma menor quantidade de triptofano para a síntese de 5-HT e um maior influxo de quinurenina para o SNC. As citocinas inflamatórias e os macrófagos ativados amplificam a neuroinflamação e, conseqüentemente, a ativação da via das quinureninas no parênquima cerebral (3). No SNC, a quinurenina pode ser metabolizada por duas vias diferentes formando ácido quinolínico e ácido quinurênico (4), compostos que possuem efeitos opostos. Fonte: modificado de Haroon; Raison; Miller (2012).

O ácido quinurênico é uma molécula neuroprotetora com atividade antagonista não-seletiva dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) e propriedades antioxidantes (SCHWARCZ et al., 2012). Já o ácido quinolínico favorece a excitotoxicidade por ser capaz de ativar seletivamente os NMDAr, favorecendo a liberação de glutamato ao mesmo tempo que inibe a recaptação astrocitária deste neurotransmissor (SCHWARCZ et al., 2012). Portanto, os compostos formados juntamente com o ácido quinolínico pela microglia são neurotóxicos, com

elevada capacidade auto-oxidante, capazes de gerar radicais livre e favorecer a peroxidação lipídica (MADDISON; GIORGINI, 2015). Indivíduos com TB apresentam uma redução no índice periférico de ácido quinurênico/ácido quinolínico indicando uma menor concentração do composto neuroprotetor (SAVITZ et al., 2015). Além disso, as citocinas inflamatórias tem um importante papel na ativação da via das quinureninas. Em pacientes com TB e TDM, maiores níveis séricos de proteína C reativa (PCR), interferon (IFN) γ , interleucina (IL) 6 e fator de necrose tumoral (TNF) α correlacionam-se com maiores concentrações periféricas de quinurenina e seus compostos neurotóxicos em detrimento dos níveis de triptofano (SAVITZ et al., 2015; VAN DEN AMEELE et al., 2018). Ainda, menores concentrações plasmáticas de triptofano e ácido quinurênico observadas em pacientes com transtornos de humor correlacionam-se à gravidade dos sintomas depressivos e poderiam funcionar como um biomarcador com potencial de predição diagnóstica (LIU et al., 2018).

Porém, a hipótese monoaminérgica não é mais capaz de elucidar completamente a fisiopatologia dos transtornos de humor. Presume-se que o equilíbrio entre impulsos excitatórios e inibitórios seja essencial para o processamento de informações e preservação de funções cognitivas. Portanto, novas terapias vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de modular também a neurotransmissão de ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato – os principais neurotransmissores inibitório e excitatório, respectivamente (WILKINSON; SANACORA, 2018). A desregulação dos níveis destes principais impulsos leva a uma alteração da atividade e do estado de repouso neural, que, cronicamente, pode resultar em uma má adaptação destes sistemas neuronais contribuindo para o aparecimento dos sintomas de humor (FEE; BANASR; SIBILLE, 2017). A própria razão entre GABA e glutamato parece estar alterada em pacientes com TDM (SANACORA et al., 2004). Ainda não há um consenso sobre os níveis – tanto periféricos como centrais – destes neurotransmissores em pacientes com transtornos de humor devido à dificuldade dos estudos em controlar os efeitos de medicação e do metabolismo *post mortem* (BRADY et al., 2013; SANACORA et al., 2008). Mesmo assim, aparentemente, os pacientes que apresentam uma redução de GABA cortical parecem ter maiores prejuízos cognitivos, especialmente em relação ao controle inibitório (BHAGWAGAR et al., 2008; LUSCHER; SHEN; SAHIR, 2011; SANACORA et al., 2004). Por outro lado, altos níveis de glutamato já foram observados no córtex pré-frontal de indivíduos com TB (HASHIMOTO; SAWA; IYO, 2007). Portanto, um melhor entendimento sobre o papel do GABA e do glutamato na etiologia dos transtornos de humor é fundamental bem como a

modulação destes dois neurotransmissores possibilita a utilização de novas terapias farmacológicas (HENTER et al., 2017).

1.2.3 Sistema imune e inflamação

A relação dos transtornos psiquiátricos com a inflamação não é um assunto tão recente, mas – devido à falta de efetividade das terapias atuais – a mesma tem atraído atenção de muitos pesquisadores na última década, sendo significativamente implicada na fisiopatologia dos transtornos de humor (FAGGIONI; BENIGNI; GHEZZI, 1995; ROSENBLAT et al., 2014). O maior número de evidências do aumento de parâmetros inflamatórios é relatado no TDM, mas esta alteração também é observada no TB. Portanto, os transtornos de humor estão associados a um estado pró-inflamatório, possivelmente crônico e de baixa intensidade (do inglês *low-grade*), sendo que no TB estes níveis podem variar dependendo do tipo de episódio de humor (ROSENBLAT; MCINTYRE, 2016). Um estudo do nosso grupo demonstrou que culturas de macrófagos expostos ao soro de indivíduos com TB, em episódios de mania e depressão, exibiram um aumento na secreção de IL-1 β e TNF α , quando comparados àqueles macrófagos tratados com soro de pacientes eutímicos (FERRARI et al., 2018). Esta evidência indica que pode haver uma diferença na composição plasmática de pacientes em episódios agudos e em remissão, além de sugerir o macrófago como perpetuador da inflamação sistêmica – relação semelhante da microglia com a inflamação central, como ainda será discutido nesta seção.

Indivíduos com TDM apresentam um aumento significativo na produção de mediadores inflamatórios – como PCR, IL-1 β e IL-6 e TNF α –, o que aparenta ter relação direta com o desenvolvimento dos sintomas depressivos, tanto por interferirem na neurotransmissão monoaminérgica e catecolaminérgica (HAAPAKOSKI et al., 2015; SPERNER-UNTERWEGER; KOHL; FUCHS, 2014), bem como por estarem associados a menor responsividade ao tratamento antidepressivo (HAROON; RAISON; MILLER, 2012; LANQUILLON et al., 2000). O aumento de TNF α e IL-6 também já foi relatado no TB e associados a um maior tempo de doença (KAUER-SANT'ANNA et al., 2009). As alterações de parâmetros inflamatórios como IL-6 e PCR em indivíduos com TB são mais observadas em episódios de mania e podem ser dependente de sexo, sendo mais robustas em mulheres (QUEISSNER et al., 2018). Ainda, o aumento da contagem de leucócitos – em aproximadamente 23% – já foi relatado no TB em indivíduos eutímicos quando comparados a

indivíduos saudáveis, sendo ainda relacionado com o estágio da doença (MUNKHOLM; VINBERG; VEDEL KESSING, 2013; TATAY-MANTEIGA et al., 2017). Dados recentes de uma coorte retrospectiva de pacientes com doenças inflamatórias – como doenças intestinais, esclerose múltipla e artrite reumatoide – indicam que há uma maior incidência de transtornos de humor nestas populações (MARRIE et al., 2017). Evidências como estas contribuem para a hipótese de que alterações periféricas, como o aumento de estímulos pró-inflamatórias, podem atingir o SNC e desencadear os sintomas de humor (FELGER, 2018). Entretanto, ainda não existe um consenso sobre o início – periférico ou central – das alterações na resposta imune em indivíduos com transtornos de humor, mas acredita-se que haja uma relação bidirecional (ROSENBLAT et al., 2014).

A hipótese de como estas citocinas inflamatórias periféricas seriam capazes de atingir o SNC, e vice-versa, inclui três possíveis rotas: humoral, neural e celular (Figura 3) (DANTZER et al., 2008a; MILLER et al., 2013; MILLER; RAISON, 2016). Portanto, existem fatores iniciadores e facilitadores da ativação imune que estão diretamente associados a alterações de humor. Como mencionado anteriormente, o estresse é um fator preditor importante dos transtornos de humor capaz de desencadear uma resposta inflamatória (ANISMAN, 2009; KENDLER; THORNTON; GARDNER, 2001) – conforme descrito na seção 1.2.1. Ainda, outro fator muito discutido atualmente e que também está associado a ativação da resposta imune periférica e central é a disbiose, podendo também ser consequência de um fator estressor (KELLY et al., 2015). O desequilíbrio da microbiota intestinal está correlacionado com a qualidade de vida do indivíduo e com a incidência de depressão (VALLES-COLOMER et al., 2019), o que sugere a interação de um eixo intestino-cérebro (do inglês, *gut-brain axis*) (KELLY et al., 2015; SKONIECZNA-ŻYDECKA et al., 2018).

Como consequência destes fatores, moléculas conhecidas como padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*) e a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) são produzidas levando à ativação de células do sistema imune, principalmente os monócitos atuando em receptores do tipo Toll (TLR) e NOD (NLR) (MATHUR; HAYWARD; MAN, 2018). No citoplasma destas células, ocorre a formação de inflamassomas com consequente ativação de NFκB – importante fator promotor da transcrição de genes inflamatórios – e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-18, IL-6, IFN e TNF (FLESHNER; FRANK; MAIER, 2017; MATHUR; HAYWARD; MAN, 2018). Logo, estas citocinas são capazes de atingir o SNC ao atravessar a

barreira hematoencefálica (BHE) e por aferência vagal, caracterizando a rota humoral e neural, respectivamente (Figure 3) (BLUTHÉ et al., 1994; DANTZER, 2001; QUAN; BANKS, 2007). Além da ativação de células imunes periféricas, situações estressoras também levam a ativação dos macrófagos residentes do parênquima cerebral, a microglia (ALBORNOZ; WOODRUFF; GORDON, 2018; MILLER; RAISON, 2016). Uma vez ativada, a microglia libera fatores quimiotáticos que acabam por atrair monócitos ativados do sangue que, no SNC, intensificam a neuroinflamação – caracterizando a via celular (Figure 3) (HAROON; RAISON; MILLER, 2012).

A amplificação da inflamação no SNC é essencialmente resultado da ativação da microglia. Assim como os monócitos e macrófagos da periferia, a microglia possui um papel importante na proteção do parênquima cerebral, permanecendo em constante vigilância em um estado de repouso (do inglês, *resting state*) (NAKAGAWA; CHIBA, 2014). Por possuir uma alta plasticidade, a microglia pode exibir dois fenótipos principais de ativação – o clássico ou pro-inflamatório, e o alternativo ou anti-inflamatório (FRANCO; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, 2015). Estes fenótipos de ativação são denominados M1 e M2, respectivamente. Estímulos como lipopolissacarídeo (LPS), IFN γ e TNF α levam a polarização M1 desta célula e, como observado na periferia, há uma amplificação do processo inflamatório caracterizado pelo aumento da expressão e produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014; FRANCO; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, 2015). Ainda, a ativação deste fenótipo pró-inflamatório é capaz de suprimir a liberação de citocinas anti-inflamatórias, produzidas pelo fenótipo M2 (FERRANTE; LEIBOVICH, 2012). Nas mesmas condições patológicas que o perfil M1 é ativado, a polarização M2 é concomitantemente ativada sendo responsável pelo controle e reparo do dano (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014). Assim, acredita-se que nos transtornos de humor haja uma falta de equilíbrio na ativação destes fenótipos (NAKAGAWA; CHIBA, 2014, 2015). Portanto, a hipótese inflamatória já foi corroborada também por evidências em nível central. Achados de um estudo *post mortem* indicam que há um aumento da densidade de microglia ativada, bem como do recrutamento de macrófagos, no córtex de indivíduos depressivos que cometeram suicídio (TORRES-PLATAS et al., 2014). Estudos de neuroimagem reforçam que existe uma maior ativação microglial nos córtex pré-frontal, cíngulo anterior e insula de pacientes em episódios depressivos quando comparados a indivíduos controles (SETIAWAN et al., 2015). O mesmo indício de neuroinflamação como resultado da ativação microglial já foi observado no hipocampo de indivíduos com TB

(HAARMAN et al., 2014, 2016). Embora seja difícil identificar qual fenótipo que essas células apresentam, evidências como estas são importantes para o entendimento do processo inflamatório no SNC de indivíduos com transtornos de humor.

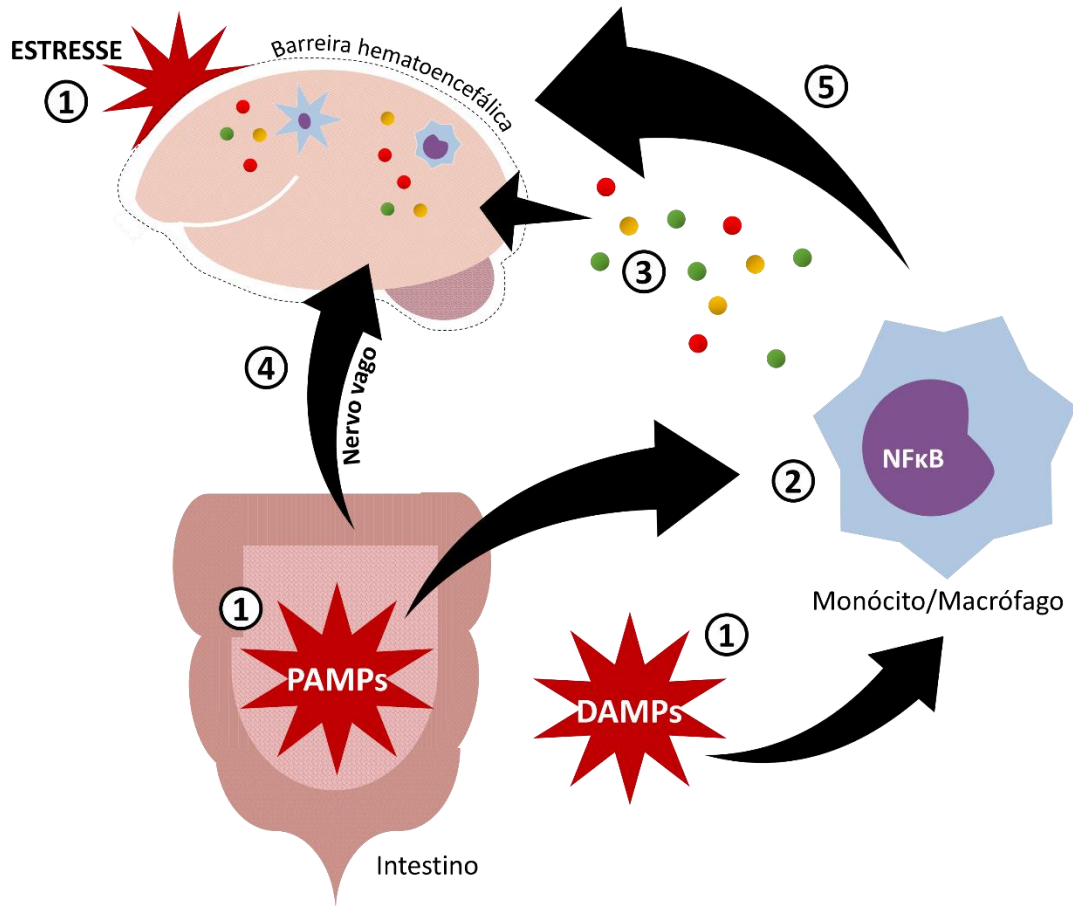


Figura 3. Vias envolvidas na comunicação entre inflamação periférica e central. Em consequência ao estresse, moléculas como DAMPs e PAMPs são liberadas na periferia (1), que ativam monócitos e macrófagos periféricos e vias inflamatórias (2). As citocinas inflamatórias produzidas atingem o parênquima cerebral após atravessar a BHE (via humoral) (3) ou por aferência vagal (via neural) (4). O estresse também é capaz de ativar a microglia (1) que pode exibir um fenótipo pró-inflamatório e secretar quimiocinas atraindo monócitos/macrófagos periféricos ativados para o parênquima cerebral (via celular) (5). Fonte: modificado de Miller; Raison (2016).

Interessantemente, o tratamento com antidepressivos parece modular as concentrações séricas de citocinas inflamatórias em indivíduos com transtornos de humor, podendo também culminar em uma menor ativação microglial. Menores concentrações de IL-6, TNF α , IL-10 e quimiocinas são observadas em indivíduos com TDM que respondem ao tratamento antidepressivo, principalmente com ISRS (KÖHLER et al., 2017; LINDQVIST et al., 2017).

No entanto, em aproximadamente um terço dos pacientes que não respondem ao tratamento tem sido demonstrado um aumento na concentração de citocinas inflamatórias. Neste sentido, é sugerido que a falta de resposta à terapia antidepressiva deva-se, em parte, a uma disfunção do sistema imune (HAROON et al., 2018). Portanto, é possível que as citocinas pró-inflamatórias, de alguma forma, sejam capazes de prejudicar os efeitos dos antidepressivos, explicando a relação das mesmas com a resistência ao tratamento – alguns mecanismos propostos estão representados na Figura 4. No SNC, os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de SERT, afetando diretamente o mecanismo de ação dos ISRS (ROBSON; QUINLAN; BLAKELY, 2017). Além disso, estas citocinas inflamatórias ao ativar tanto macrófagos como microglia redirecionam a quantidade de triptofano disponível para a via das quinureninas (discutida na seção 1.2.2), conseqüentemente diminuindo a produção de 5-HT (MILLER; RAISON, 2016). Com a ativação desta via, o ácido quinolínico, com ação agonista NMDAr, é sintetizado e promove o aumento de glutamato na fenda sináptica (RAMÍREZ et al., 2018). Em condições fisiológicas, os astrócitos são responsáveis pela regulação da quantidade de glutamato na fenda sináptica, realizando a remoção do excesso deste neurotransmissor (MAHMOUD et al., 2019). No entanto, na presença de citocinas inflamatórias, a função astrocitária fica prejudicada. A ação destas citocinas sobre o astrócito ocorre tanto de forma direta ao promover a diminuição da recaptção e aumento da liberação de glutamato; bem como, indiretamente, ao aumentar o metabolismo tecidual gerando EROs, após a ativação microglial (EFREMOVA et al., 2017; HAROON; MILLER, 2017).

Outra consequência importante dos níveis aumentados de citocinas inflamatórias no SNC e do excesso de glutamato é a redução de BDNF, que também é modulado e necessário para os efeitos da terapia antidepressiva (BJÖRKHOLM; MONTEGGIA, 2016). No hipocampo, as citocinas inflamatórias ativam a via do NFκB, o que leva à amplificação da cascata inflamatória e, conseqüentemente, à inibição da diferenciação neuronal – processo estimulado pelo BDNF (LEAL; BRAMHAM; DUARTE, 2017) (Figura 4). Assim, a diminuição dos níveis e do efeito desta neurotrofina resultam em alterações cognitivas, prejudicando aprendizado e memória, constantemente observadas em indivíduos com transtornos de humor (LIU et al., 2019), principalmente naqueles que não respondem ao tratamento (BRUDER et al., 2014).

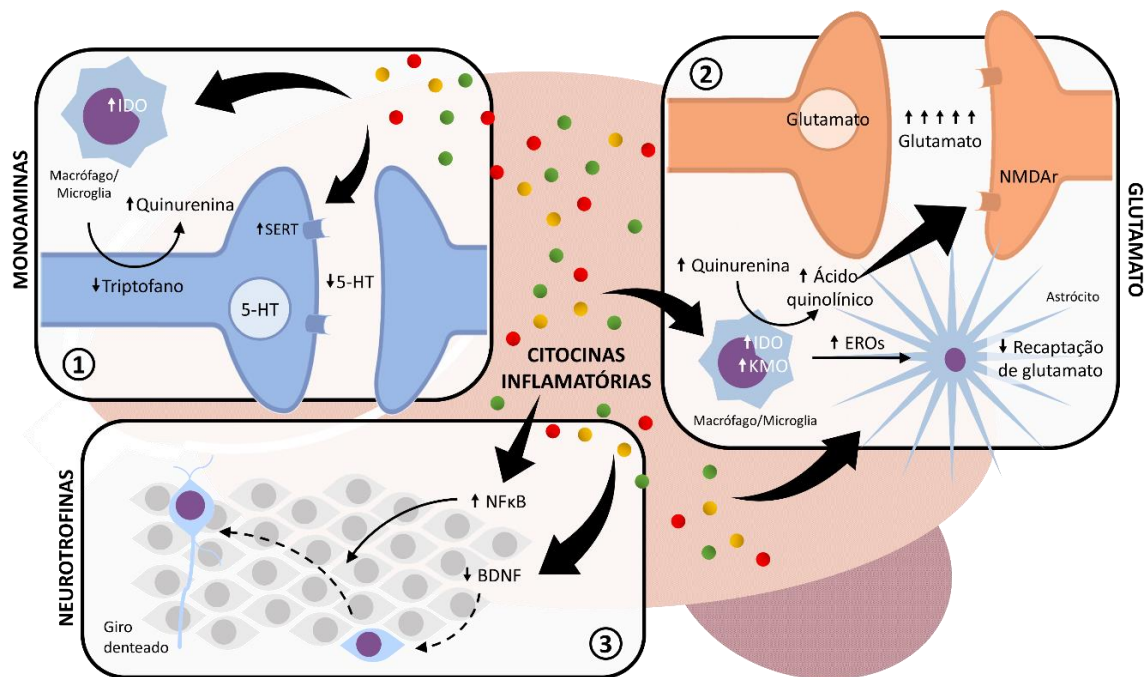


Figura 4. Efeitos centrais das citocinas inflamatórias no metabolismo de neurotransmissores e na neuroplasticidade. (1) Citocinas pró-inflamatórias diminuem a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica favorecendo a expressão de seus transportadores (*i.e.*, SERT). Ainda, a presença de macrófagos ativados ou a ativação da microglia resulta no aumento da atividade da IDO, deslocando o triptofano para a via das quinureninas, aumentando a produção de seus metabólitos. (2) A microglia ativada acaba por produzir ácido quinolínico que favorece a liberação de glutamato. EROs também gerados pela microglia alteram a função astrocitária que contribui para a excitotoxicidade e a redução de BDNF. (3) Em regiões de elevada neurogênese (*i.e.*, giro dentado do hipocampo), as citocinas pró-inflamatórias – bem como a ativação de vias inflamatórias como do NFκB – prejudicam a função do BDNF na plasticidade sináptica. Fonte: modificado de Miller; Raison (2016).

Além das alterações de humor, os pacientes frequentemente apresentam comorbidades médicas associadas, especialmente doenças que culminam com um perfil inflamatório (ANISMAN; HAYLEY, 2012). A prevalência de síndrome metabólica é relativamente alta em indivíduos com TDM e TB sendo maior que 30% (DE MELO et al., 2017; VANCAMPFORT et al., 2015). Logo, indivíduos com transtornos de humor tem maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidade e resistência à insulina. Da mesma forma, sintomas depressivos são frequentemente observados em indivíduos com síndrome metabólica que também é caracterizada por um estado inflamatório basal, indicando uma inter-relação entre estas condições (CAPURON et al., 2008; SAYURIYAMAGATA et al., 2017). No TB, maiores índices corporais estão associados a maiores níveis de citocinas inflamatórias,

mais especificamente concentrações séricas aumentadas de IL-1a e MCP-1, que, por sua vez, podem ser preditoras de recidiva de sintoma depressivo (BOND et al., 2016). Assim, em condições em que já se observa o envolvimento do sistema imune, como na presença de algumas comorbidades, o uso de compostos anti-inflamatórios pode auxiliar na melhora da resposta às terapias já existentes (ROSENBLAT; GREGORY; MCINTYRE, 2016). Portanto, a modulação do sistema imune com consequente redução de fatores pró-inflamatórios pode ser vislumbrada como uma possibilidade de alvo para novas terapias.

1.2.4 Neurotrofinas: o papel do BDNF

As neurotrofinas são polipeptídeos essenciais na promoção da neurogênese, neuroplasticidade e diferenciação e sobrevivência celular, sendo o BDNF uma das principais e mais abundante neurotrofina do SNC (VON BOHLEN UND HALBACH, 2018). De forma geral, as neurotrofinas são sintetizadas inicialmente como proneurotrofinas. No caso do BDNF, seu precursor proBDNF sofre processamento proteico por ação de proteases, resultando na formação da neurotrofina madura. Em sua conformação madura, o BDNF exerce sua ação neuroprotetora pela ligação preferencial a receptores tirosina quinase B (TrkB) e ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), fosfolipase C γ e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), vias que promovem diferenciação e sobrevivência celular e plasticidade sináptica (LIMA GIACOBBO et al., 2018). Porém, o proBDNF também age como uma molécula sinalizador, exercendo efeitos opostos ao BDNF. Ao ligar-se a receptores específicos (*i.e.*, p75NTR), o precursor do BDNF promove apoptose e inibição do crescimento de neuritos, além de facilitar a depressão de longa duração (LTD) – condição que leva ao enfraquecimento da transmissão sináptica (RAFIEVA; GASANOV, 2016). Em humanos, a principal fonte de BDNF periférico encontra-se nos megacariócitos e plaquetas, mas os efeitos de BDNF de outras fontes que não do SNC ainda necessita esclarecimentos (SASI et al., 2017). Já no encéfalo, a expressão de RNAm e da proteína BDNF são maiores no hipocampo, mas não são exclusivos desta região. Portanto, a presença de BDNF no hipocampo permite a renovação celular local e o fortalecimento das conexões sinápticas, resultando na consolidação do processo de aprendizado e memória (HUANG; REICHARDT, 2001).

A plasticidade sináptica observada no hipocampo é resultado da potenciação de longa duração (LTP) que dependem e são facilitados pela presença de BDNF em terminais pré- e pós-

sinápticos (BJÖRKHOLM; MONTEGGIA, 2016). Além de ser controlada pela atividade neuronal, a expressão de BDNF também sofre modulação decorrentes de estresse e inflamação. Condições de estresse transientes aumentam a expressão de BDNF, resultando em adaptação ao estresse – o que confere resiliência (PITTENGER; DUMAN, 2008; SHI et al., 2010). Porém, elevadas concentrações de glicocorticoides, decorrentes de estresse crônico ou hiperatividade do eixo HPA, suprimem a expressão de BDNF no hipocampo (NUMAKAWA; ODAKA; ADACHI, 2017; SMITH et al., 1995). Embora o mecanismo pelo qual ocorra essa regulação não esteja bem estabelecido, acredita-se que ocorra uma modulação bidirecional (DASKALAKIS et al., 2015). Bem como mencionado anteriormente, o estresse também promove a ativação de vias inflamatórias como a do NFκB. Acredita-se que seja por esta via que a atividade neurogênica do BDNF possa ser bloqueada (KOO et al., 2010; LIMA GIACOBBO et al., 2018) (Figura 5).

A redução da neurogênese e plasticidade sináptica, em decorrência de estresse e inflamação, contribui para alterações estruturais em regiões encefálicas (MONJE; TODA; PALMER, 2003). Por exemplo, o volume hipocampal encontra-se reduzido nos pacientes em episódio quando comparado àqueles com remissão de sintomas, o que leva aos prejuízos cognitivos observados no TDM e TB (CAO et al., 2016). Portanto, é comum observar a redução nas concentrações periféricas de BDNF nestes indivíduos. No TDM, pacientes apresentam concentrações séricas de BDNF reduzidas em comparação a indivíduos saudáveis, e aqueles com os menores níveis, normalmente, já experienciaram um maior número de episódios (CATTANEO et al., 2016). Achados em indivíduos com TB – medicados ou não – em diferentes episódios de humor indicam que as concentrações séricas de BDNF estão diminuídas durante a eutímia, depressão e mania quando comparadas às concentrações em indivíduos saudáveis (DE OLIVEIRA et al., 2009; MACHADO-VIEIRA et al., 2007; MORA et al., 2019). Ainda, menores concentrações de BDNF estão associadas a estágios mais avançados da doença, enquanto que pacientes com maiores concentrações apresentam um melhor funcionamento cognitivo (KAUER-SANT'ANNA et al., 2009; MORA et al., 2019). Estudos *post mortem* indicam que as concentrações de BDNF também estão reduzidas no córtex pré-frontal de indivíduos com TDM (NUNES et al., 2018). Enquanto que pacientes tratados com antidepressivos apresentam aumento de BDNF e da neurotrofina 3 (NT-3) em diversas regiões do córtex, quando comparados a pacientes não tratados e controles (SHELDRICK et al., 2017). Ainda, nos indivíduos não tratados, os autores observaram uma redução de NT-3 no córtex parietal em comparação aos indivíduos controles.

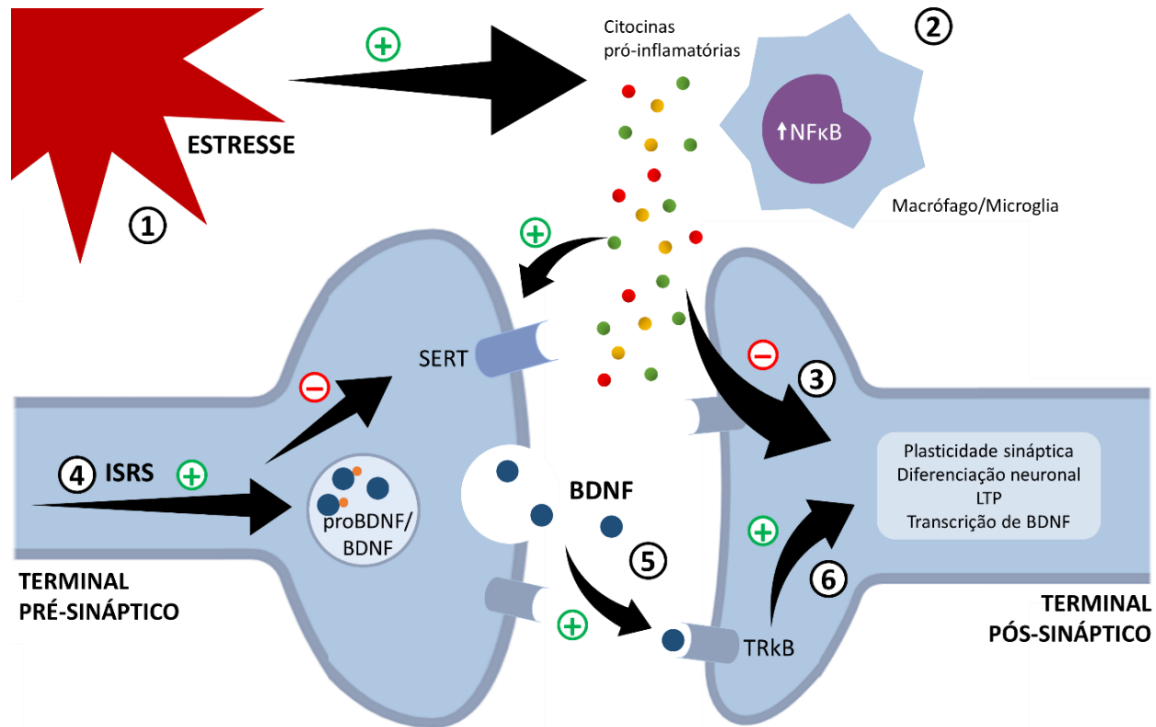


Figura 5. Efeito da inflamação na modulação de mecanismos de neuroplasticidade dependentes de BDNF. Fatores estressores (1), especialmente crônicos, geram DAMPs e PAMPs que acabam por ativar macrófagos e microglia aumentando a expressão de vias pró-inflamatórias (e.g., NFκB) (2). As citocinas pró-inflamatórias liberadas favorecem o aumento da expressão de SERT, reduzindo a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica, e ativam vias neuronais que inibem a transcrição de BDNF e seus efeitos neuroprotetores (3). Entretanto, os fármacos antidepressivos, como os ISRS, inibem os SERT, aumentando a neurotransmissão serotoninérgica que contribui para a transcrição e a liberação de BDNF (4). O BDNF liga-se com a afinidade ao seu receptor TrkB (5) atuando no fortalecimento e plasticidade sináptica (6). Fonte: modificado de Lima Giacobbo et al (2018).

Portanto, o tratamento dos transtornos de humor parece na maioria das vezes contribuir para o aumento dos níveis de BDNF (NUERNBERG et al., 2016; TRAMONTINA et al., 2009). Parte desta ativação ocorre principalmente pela redução da acetilação na região promotora do gene do BDNF (DWIVEDI; ZHANG, 2015). Da mesma forma, já foi observado que a maioria das classes de antidepressivos promovem a autofosforilação do receptor TrkB, desencadeando os efeitos protetores da neurotrofina (AUTRY; MONTEGGIA, 2012; CASTRÉN; KOJIMA, 2017). Acredita-se que em parte o mecanismo de ação dos antidepressivos na melhora dos sintomas é resultado da ação dos mesmos na neurogênese hipocampal, mediada pelo aumento de 5-HT, processo importante nas alterações de comportamento e na formação e fortalecimento das sinapses (KRAUS et al., 2017). Conforme mencionado, a liberação de BDNF é dependente

de atividade neuronal, incluindo a neurotransmissão serotoninérgica. Porém, o BDNF liberado também acaba por modular a atividade da 5-HT ao promover o aumento da expressão de SERT (MARTINOWICH; LU, 2008). Consequentemente, haverá uma redução na expressão do BDNF, funcionando como um mecanismo de retroalimentação negativa. Nos transtornos de humor, o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias contribui para uma exacerbada expressão de SERT por neurônios, disponibilizando menos 5-HT na fenda sináptica, bem como BDNF (HAASE; BROWN, 2015). Em contrapartida, o tratamento crônico com antidepressivos, como os ISRS, promove o aumento da disponibilidade de 5-HT, pelo bloqueio da sua recaptação, que resulta em uma maior atividade neuronal e em longo prazo promove um aumento da expressão de BDNF por vias dependentes de CREB fosforilado – conforme descrito na seção 1.2.2 (Figura 5).

Assim, o papel do BDNF na fisiopatologia dos transtornos de humor é ainda corroborado pelo fato do tratamento com antidepressivos e estabilizadores de humor, por exemplo, melhorarem a sintomatologia clínica correlacionando-se com maiores concentrações periféricas de BDNF (BJÖRKHOLM; MONTEGGIA, 2016; BRUNONI; LOPES; FREGNI, 2008; KAPCZINSKI et al., 2008). Porém, apenas o aumento da neuroplasticidade por parte dos antidepressivos parece não ser suficiente para os seus efeitos antidepressivos, o que reforça a importância do entendimento das interações dos mecanismos fisiopatológicos dos transtornos de humor.

1.2.5 Estresse oxidativo: ativador e amplificador da resposta imune

Todos os processos celulares mencionados até agora – como fosforilação de receptores, ativação de fatores de transcrição, apoptose celular, resposta imune e diferenciação celular – são dependentes da produção de espécies reativas (PIZZINO et al., 2017). Assim, baixos níveis de EROs e ERNs desempenham um papel importante no funcionamento celular em condições fisiológicas, podendo ser danoso quando não ocorrer de forma controlada e compensatória. O aumento dos processos oxidativos, resultando em uma maior produção de EROs, associado à redução da capacidade antioxidante é capaz de promover danos oxidativos à membrana celular, a proteínas e ao material genético podendo levar à apoptose (MORRIS et al., 2018). Logo, o estresse oxidativo está relacionado ao início e progressão de diversas doenças, incluindo os transtornos de humor (BLACK et al., 2015).

De forma geral, indivíduos com transtornos de humor apresentam níveis periféricos aumentados de marcadores biológicos de estresse oxidativo (SOWA-KUĆMA et al., 2018). No TDM, além do aumento de marcadores inflamatórios, os pacientes apresentam maiores concentrações séricas de parâmetros de estresse oxidativo como F2-isoprostanos, 8-OH 2-desoxiguanosina e malondialdeído (MDA), que também correlacionam-se com a falta de resposta aos ISRS (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2015; LINDQVIST et al., 2017). Além disso, a atividade de importantes enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, estão reduzidas em pacientes com TDM, quando comparados a controles saudáveis, e correlacionam-se com a severidade dos sintomas depressivos (CAMKURT et al., 2016). A atividade reduzida de glutatona também já foi observada em indivíduos com TDM e TB, sendo a forma oxidada mais presente (GAWRYLUK et al., 2011; ROSA et al., 2014b). Da mesma forma como ocorre com o BDNF, o tratamento com antidepressivos e estabilizadores de humor ainda parece melhorar a resposta a danos oxidativos, reduzindo a formação de compostos oxidativos danosos e aumentando a capacidade antioxidante nos pacientes (BEHR; MOREIRA; FREY, 2012; BENGESSER et al., 2016; LIU et al., 2015).

EROs e ERNs são consideradas ativadoras de vias inflamatórias. A oxidação e nitração de componentes celulares leva a formação de DAMPs e PAMPs que são reconhecidas por receptores específicos gerando ativação de vias inflamatórias – como do inflamassoma e NFκB (conforme descrito na seção 1.2.3) (CHATTERJEE, 2016). As alterações conformacionais proteicas resultam na disfunção da sua atividade e sinalização para sua degradação (LUGRIN et al., 2014). Enquanto que a oxidação de ácidos graxos presentes na membrana celular desencadeia uma reação de peroxidação lipídica e aumenta a permeabilidade desta estrutura, que associada a danos ao DNA, também causados por EROs e ERNS, ativam vias de apoptose celular (LUGRIN et al., 2014). Evidências acerca do TDM, indicam que a alteração estrutural destes componentes celulares, decorrentes do estresse oxidativo, pode formar neoantígenos – estruturas com alta imunogenicidade capazes de desencadear respostas autoimunes (MAES et al., 2011). Porém, a formação de radicais livres também é uma consequência do processo inflamatório (Figura 6). Conforme mencionado anteriormente, a ativação de células do sistema imune, como os monócitos, também resulta na produção de EROS e ERNS e, por sua vez, estas espécies reativas também ativam vias que levam à amplificação da resposta inflamatória. Sem o intermédio do sistema imune, o estresse psicossocial também é capaz de alterar o equilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, gerando um estado pró-oxidativo – normalmente

por redução de glutathione – que é favorecido pela excitotoxicidade glutamatergica (SALIM, 2017).

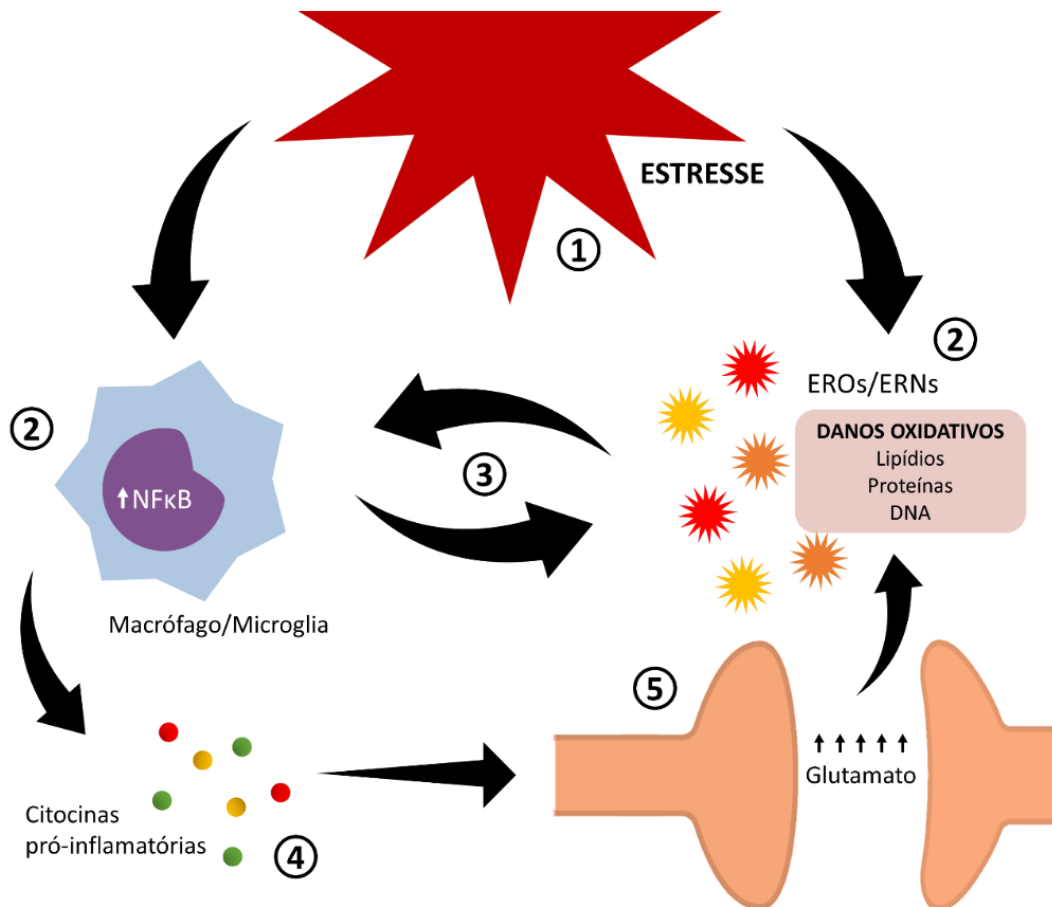


Figura 6. EROs/ERNs como promotores e produtos da inflamação. O estresse psicossocial (1), além de promover a ativação de macrófagos ou microglia (2), também gera estresse oxidativo (2). Este processo é caracterizado pelo aumento da produção de EROs e ERNs capazes de interagir com diversos componentes celulares. Logo, DAMPs são geradas e também ativam macrófagos e microglia que produzem EROs/ERNs (3). Ainda, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em nível central promove alteração do metabolismo de diversos neurotransmissores (4). A excitotoxicidade glutamatergica, por exemplo, é um importante fator que contribui para o aumento do estresse oxidativo e seus danos associados (5).

A relação entre os mecanismos fisiopatológicos dos transtornos de humor é complexa, mas é capaz de explicar a manifestação dos sintomas de humor, bem como a falta de resposta ao tratamento em algumas situações. Kapczinski e cols. (2010) foram os primeiros a avaliar *en bloc* parâmetros neurotróficos, de estresse oxidativo e inflamatórios em sangue periférico de indivíduos com TB, atribuindo um índice de toxicidade sistêmica (*systemic toxicity index*, STI).

Durante episódios de humor, os pacientes apresentaram um STI mais elevado quando comparados a indivíduos eufímicos e saudáveis. Ainda, mesmo durante a eutímia, o índice nos pacientes era mais elevado que em indivíduos saudáveis (KAPCZINSKI et al., 2010). Este achado corrobora e resume as evidências até agora apresentadas acerca de parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo, bem como dá suporte para o caráter multi-sistêmico dos transtornos de humor. Portanto, mesmo que estressores psicossociais sejam capazes de ativar vias inflamatórias no SNC, elevados índices de toxicidade sistêmica parecem contribuir significativamente para a fisiopatologia e sintomatologia destes transtornos, indicando uma comunicação entre as alterações periféricas e centrais.

1.3 BHE: POSSÍVEL MEDIADORA DAS ALTERAÇÕES PERIFÉRICO-CENTRAIS

Na metade do século XX, presumia-se que o SNC tinha privilégio imune (do inglês, *immune privilege*), ou seja, era capaz de tolerar a presença de antígenos sem desencadear uma resposta imune. Este conceito estava fundamentado no fato do SNC estar isolado do sistema imune por mediação da BHE e pela falta de um sistema de drenagem linfática clássico e de imunocompetência da microglia, e que posteriormente foi refutado (CARSON et al., 2006; LOUVEAU; HARRIS; KIPNIS, 2015). Conforme discutido na seção 1.2.3, a inflamação periférica é capaz de desencadear uma resposta inflamatória central, bem como os fatores estressores (DANTZER et al., 2008a). Assim, na tentativa de identificar uma interface que contribua e correlacione as alterações periféricas e centrais observadas nos transtornos psiquiátricos, estudos da última década vem atribuindo destaque à alteração da permeabilidade da BHE (NEUWELT et al., 2011).

A BHE é composta por células endoteliais dos capilares cerebrais (BEC) justapostas – unidas por proteínas de oclusão do tipo *tight junction* –, pericitos e astrócitos (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006). Esta organização estrutural é o que permite o controle do transporte de substâncias entre o sangue e o parênquima cerebral. A passagem de moléculas pela BHE pode ocorrer por difusão transcelular para substâncias pequenas e lipofílicas, por intermédio de proteínas carreadoras para moléculas aquosas, por transcitose mediada por receptor para moléculas maiores (como peptídeos) ou por transcitose independente de receptor (ERICKSON; BANKS, 2018). Portanto, a alteração da permeabilidade (ou ruptura) da BHE permite que substâncias com acesso restrito ao parênquima cerebral sejam capazes de atravessá-

la, como a albumina, sendo decorrente de uma redução da expressão de *tight junctions* e danos às BEC.

Evidências indicam que alterações na homeostase da BHE podem estar associadas ao aumento nos níveis periféricos de citocinas inflamatórias e de EROs e ERNs (PATEL; FREY, 2015; PFAU; MÉNARD; RUSSO, 2018; SHALEV; SERLIN; FRIEDMAN, 2009). As BEC, por exemplo, possuem receptores TLR e NLR, cuja a expressão é modulada por PAMPs e DAMPs (e.g. LPS, citocinas pró-inflamatórias, EROs/ERNs) como mencionado previamente (seção 1.2.3). As próprias citocinas inflamatórias, em sua grande maioria, são capazes de atravessar a BHE – sendo caracterizado por um transporte saturável e seletivo (QUAN; BANKS, 2007). Já a passagem de células imunes provenientes da periferia é um processo mais restrito e altamente regulado. Acredita-se que em condições fisiológicas esta migração não ocorra ou ocorra com baixa frequência (ERICKSON; BANKS, 2018). Entretanto, linfócitos T são encontrados nos plexos coroides e nos espaços inter-meninges e podem secretar fatores solúveis (e.g., $IFN\gamma$), capazes de atingir o parênquima cerebral e, até mesmo, modular o comportamento conforme observado em modelos animais (FILIANO; GADANI; KIPNIS, 2017).

Dada a importância da inflamação na fisiopatologia dos transtornos de humor, estudos envolvendo a ativação de resposta inflamatória periférica permitem elucidar o papel da BHE como mediadora da inflamação no eixo periférico-central. Por exemplo, a administração aguda de LPS é capaz de induzir a ativação imunológica e, portanto, uma resposta inflamatória; bem como promover alterações comportamentais como o *sickness behavior* e o comportamento tipo-depressivo (vide seção 1.4.1). Estes mecanismos foram revisados e compilados por Erickson e Banks (2018) e estão representados na Figura 7. Embora já se saiba que doenças do SNC estão associadas a um aumento da permeabilidade cerebrovascular, ainda não há um consenso quanto a alteração de permeabilidade da BHE ser causa ou consequência destas doenças (NEUWELT et al., 2011). Portanto, o entendimento das alterações estruturais e funcionais da BHE em condições fisiológicas e patológicas devem ser melhor estudadas e exploradas com o intuito de contribuir para o entendimento da fisiopatologia de doenças como os transtornos de humor e o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas.

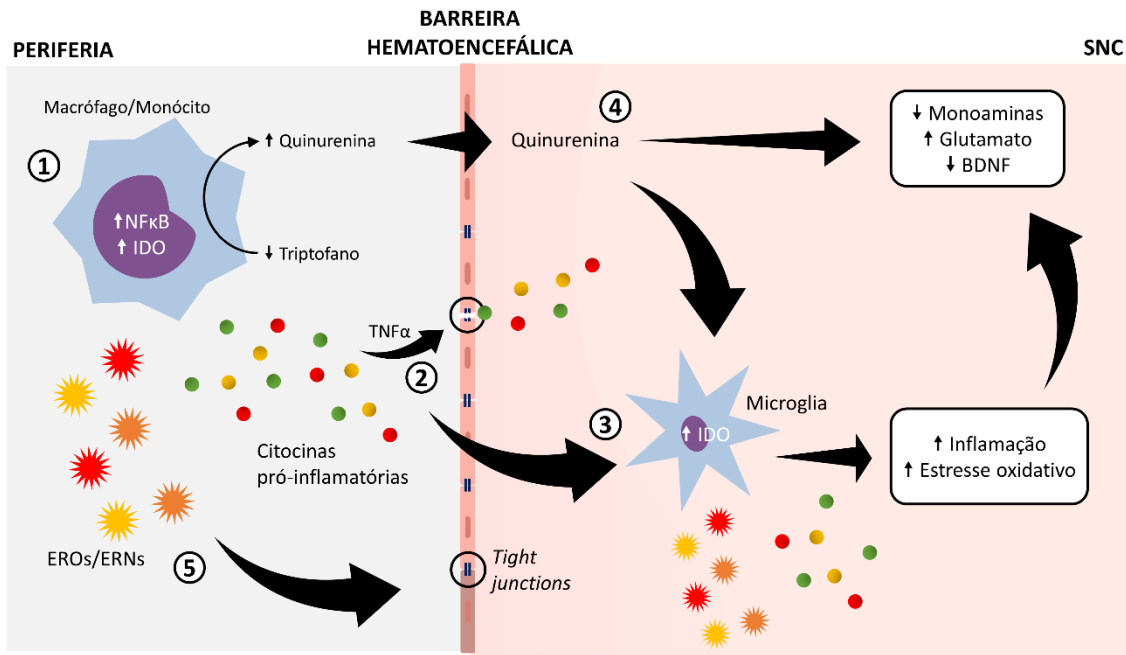


Figura 7. Mecanismos de interação da inflamação periférica com a BHE e efeitos centrais. A alteração da permeabilidade da BHE parece estar relacionada ao dano às BEC ou com a alteração da expressão das tight junctions. A ativação de macrófagos e monócitos leva a produção de citocinas pró-inflamatórias e EROs/ERNs (1). As citocinas inflamatórias contribuem para a diminuição da expressão de tight junctions (e.g., $TNF\alpha$) (2), além de atravessarem a BHE ativando a microglia, promovendo neuroinflamação e prejudicando o metabolismo de neurotransmissores (3). A ativação da IDO (1), também por efeito das citocinas pró-inflamatórias (e.g., $IFN\gamma$), ativa a via das quinureninas e aumenta o metabolismo do triptofano (4). Consequentemente, é observada uma redução da síntese e disponibilidade de 5-HT, aumento da excitotoxicidade glutamatérgica e diminuição de mecanismos neuroprotetores (e.g., BDNF). EROs/ERNs também podem contribuir para o aumento da permeabilidade da BHE ao danificarem componentes celulares das BEC (5) (e.g., oxidação de lipídios e proteínas da membrana celular).

1.4 MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNOS DE HUMOR

Até o momento, vários modelos animais que mimetizam comportamentos tipo-depressivos ou tipo-maníacos e que apresentam fenótipos comparáveis à clínica são utilizados para elucidar os mecanismos fisiopatológicos dos transtornos de humor. Porém, um modelo ideal seria aquele que apresentasse analogia de sintomas com a clínica, alterações comportamentais evidentes e mensuráveis, concordância entre avaliadores, resposta ao tratamento com antidepressivos, fácil reprodutibilidade e, se possível, similaridade à etiologia

da patologia – o que caracterizam as validades de um modelo animal (Tabela 1) (CZÉH et al., 2016).

Tabela 1. Validades e aplicabilidade de modelos animais de transtornos de humor.

Validade	Definição	Aplicabilidade
Construto	O quanto o modelo reproduz dos aspectos etiológicos e fisiopatológicos	Suscetibilidade a estressores e apresentação dos mecanismos neurobiológicos, como a disfunção monoaminérgica
Face	O quanto o modelo animal mimetiza as manifestações clínicas	Comportamentos clássicos tipo-depressivos (como anedonia) e/ou tipo-maníacos (hiperatividade)
Preditiva	O quanto o modelo animal responde aos tratamentos que são eficazes na clínica	Responsividade específica e seletiva a fármacos ou compostos sabidamente antidepressivos ou estabilizadores de humor

Considerando as hipóteses apresentadas quanto a fisiopatologia dos transtornos de humor e os achados clínicos, aqueles modelos animais que associam fatores ambientais (*i.e.*, estressores) representariam melhor o que ocorre nestes transtornos pela importância do estresse como um fator de risco (validade de construto). Os sintomas de humor são essenciais para o diagnóstico e, portanto, modelos animais também devem apresentar alterações comportamentais semelhantes às manifestações clínicas e que sejam de fácil mensuração (validade de face). Logo, os modelos animais de transtornos de humor deveriam apresentar de forma geral um aumento de parâmetros inflamatórios, associados a redução de fatores neurotróficos e ao aumento de parâmetros de estresse oxidativo tanto na periferia como no encéfalo. Assim, seria possível indicar se as alterações comportamentais estariam relacionadas às alterações bioquímicas nos modelos animais; e que, assim como ocorre nos pacientes, deveria ser melhorada com o uso das primeiras linhas de tratamento, como os antidepressivos (validade preditiva). Modelos animais do TDM estão muito mais difundidos na pesquisa pré-clínica e, portanto, são mais estabelecidos, porém ainda há a necessidade de se estabelecer um modelo que melhor represente o TB. As particularidades de cada modelo animal utilizado neste trabalho estão descritas nos tópicos seguintes.

1.4.1 Modelo de inflamação aguda induzido por LPS

O desencadeamento da resposta imunológica inata pode ocorrer a partir da ativação dos receptores TLR na presença de antígenos específicos. Os LPS são endotoxinas presentes na parede celular de bactérias gram-negativas, consideradas PAMPs, e capazes de se ligar ao TLR4 desencadeando a ativação das vias da MAPK e do NF κ B (BOHANNON et al., 2013; CHMIELA; MISZCZYK; RUDNICKA, 2014). Conforme descrito anteriormente, todos estes fatores culminam no aumento da expressão de citocinas e outros mediadores inflamatórios, como EROs e ERNs, importantes para a resposta imune inata e para o reparo tecidual (LUGRIN et al., 2014).

Usualmente, na pesquisa pré-clínica, a administração de LPS segue um protocolo agudo de única ou repetidas doses que, em até 2 h, é capaz de promover o aumento das citocinas inflamatórias no soro e no encéfalo de roedores (ERICKSON; BANKS, 2011). Aumento que, conforme mencionado anteriormente, é observado em indivíduos com transtornos de humor (MAES et al., 1992; ŚLUSARCZYK et al., 2016; SWARDFAGER et al., 2016). O LPS induz principalmente a expressão de IL-1 α , IL-1 β , TNF α e IL-6 (DANTZER, 2001). Os achados mais recentes deste modelo, com protocolo semelhante ao utilizado neste trabalho, estão resumidos na Tabela 2. Portanto, pode ser observado que, associado ao aumento de citocinas inflamatórias no soro, a administração periférica de LPS também induz neuroinflamação, possivelmente pelas vias neural, hormonal e celular (descritas na seção 1.2.3) (BLUTHÉ et al., 1994; DANTZER, 1994; DANTZER et al., 2008a). A via neural parece ser a mais importante na resposta inflamatória após a administração intraperitoneal (i.p.) de LPS, sendo mediada pela expressão local de IL-1 β que atinge o encéfalo pelas fibras aferentes do nervo vago (DANTZER, 2001). Após a aferência do sinal inflamatório, acredita-se que o glutamato seja liberado em regiões do trato do núcleo solitário atuando em neurônios catecolaminérgicos que projetam para o hipotálamo (DANTZER, 2009). Assim, a ativação desta via pelo LPS atinge e repercute no eixo HPA, sabidamente modulador da inflamação, do metabolismo de BDNF e do estresse oxidativo – parâmetros que também se encontram alterados neste modelo de inflamação aguda e que se assemelham à fisiopatologia dos transtornos de humor.

Tabela 2. Efeito da administração aguda de LPS (24 h) em parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo em roedores.

Autor (Ano) Espécie	Dose única de LPS	Amostra biológica	Inflamação	Neurotrofinas	Estresse oxidativo
Wang e cols. (2019) Rato	0,83 mg/kg i.p.	Córtex e hipocampo	↑ IL-1 β , TNF α e iNOS	↓ BDNF	N/A
Barua e cols., 2018 Camundongo	0,83 mg/kg i.p.	Hipocampo	↑ IL-1 β , IL-6 e TNF α ↓ IL-10	↓ BDNF	↑ MDA
Taniguti e cols., (2018) Camundongo	0,5 mg/kg i.p.	Hipocampo	↑ TNF α	↓ BDNF	↑ MDA ↓ GSH
Khallaf e cols. (2017) Camundongo	0,8 mg/kg i.p.	Encéfalo	↑ TNF α , iNOS, nNOS	↓ BDNF	↑ MDA ↓ GSH e SOD
Jangra e cols. (2016)	0,83 mg/kg i.p.	Córtex pré-frontal e hipocampo	↑ IL-1 β ↑ TNF α no hipocampo	↓ BDNF no hipocampo	↑ MDA ↓ GSH
Li e cols. (2015) Camundongo	0,5 mg/kg i.p.	Córtex pré-frontal	↑ IL-1 β , TNF α , pNF κ B,e iNOS e COX-2	N/A	N/A
Wang e cols. (2014) Camundongo	0,83 mg/kg i.p.	Córtex pré-frontal e hipocampo	↑ IL-1 β , TNF α , pNF κ B,e iNOS ↔ COX-2	N/A	N/A
Mello e cols. (2013) Camundongo	0,5 mg/kg i.p.	Córtex frontal, hipocampo e estriado	↑ IL-1 β	↔ BDNF no hipocampo	↑ MDA ↓ GSH
Bay-Richter e cols. (2011) Rato	1 mg/kg i.p.	Soro, CSF, córtex frontal, hipocampus e estriado	↑ IL-1 β ↔ IL-6 e TNF α	N/A	N/A
O'Connor e cols. (2009)	0,83 mg/kg i.p.	Encéfalo e plasma	↑ IL-1 β , TNF α , IFN γ eIDO no encéfalo	N/A	N/A

Abreviações: LPS, lipopolissacarídeo; i.p., intraperitoneal; IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; iNOS, óxido nítrico sintase induzida; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; N/A, não avaliado; MDA, malondealdeído; nNOS, óxido nítrico sintase neuronal; SOD, superóxido dismutase; GSH, glutatona reduzida; COX, ciclooxigenase; pNF κ B, fator nuclear kappa B fosforilado; CSF, líquido cefalorraquidiano (líquor); IFN, interferon; IDO, indoleamina 2,3-dioxigenase.

Do ponto de vista comportamental, a injeção de LPS em roedores caracteriza um modelo de inflamação que mimetiza um quadro de infecção aguda, gerando respostas adaptativas para resolução do possível dano e promoção de sobrevivência (DUNN; SWIERGIEL; DE BEAUREPAIRE, 2005; HART, 1988). Após 6 h da sua administração, o LPS exerce seu maior efeito e o *sickness behavior* é o principal desfecho observado. O *sickness behavior* é caracterizado por hipofagia com diminuição do peso corporal, hiperemia, letargia ou hipomotilidade e redução do interesse exploratório e interação social, alterações comportamentais que foram associadas ao perfil depressivo observado na clínica (DUNN; SWIERGIEL; DE BEAUREPAIRE, 2005; MILLER; RAISON, 2016). O tratamento com antidepressivos também é eficiente na prevenção e reversão deste comportamento induzidos pelo LPS.

O aumento das citocinas inflamatórias está significativamente associado ao comportamento anedônico – principal sintoma da depressão (DANTZER et al., 1998; SWARDFAGER et al., 2016). Entretanto, no modelo agudo de LPS, após 24 h, pode ocorrer a resolução da inflamação sistêmica e, portanto, do *sickness behavior*. Porém, alterações comportamentais que indiquem anedonia e desamparo (do inglês, *helplessness*) após este período são congruentes com a apresentação de comportamento tipo-depressivo. Como este desfecho é dependente da intensidade do estímulo, como a dose e o número de injeções de LPS, os achados na literatura divergem. Fischer e cols. (2015), por exemplo, demonstraram que a administração crônica de LPS (75 ou 300 µg/kg/dia, de 1 a 4 semanas) promove o aparecimento de sintomas tipo-depressivos apenas na primeira semana, que é seguida da reversão completa dos parâmetros comportamentais como aumento do peso corporal, aumento da distância percorrida no campo aberto e redução do escore de imobilidade. Portanto, a falta de cronicidade neste parâmetro também é um fator limitante para este modelo animal, considerando que os transtornos de humor e mais especificamente o TDM tem um curso crônico.

1.4.2 Modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS)

Devido às comprovadas validades de construto, face e preditiva, os modelos animais de estresse crônico tem sido um dos modelos mais amplamente utilizados para mimetizar a depressão. Na literatura, existem diversos protocolos de estresse crônico, podendo ser considerados como moderado e/ou imprevisível (LEVINSTEIN; SAMUELS, 2014;

STEPANICHEV et al., 2014; WILLNER, 2017a). Quanto ao tempo de exposição ao protocolo de estresse não há consenso, sendo possível encontrar estudos que submetem os animais de 4 até 9 semanas aos estressores (CZÉH et al., 2016; WILLNER et al., 1987). A gravidade dos estressores é outro componente importante, mas esta classificação ainda é variável. De forma geral, em mais da metade dos protocolos, os estressores mais utilizados são: cama úmida, inclinação de caixa, inversão do ciclo claro-escuro, privação de água e comida, e imobilização (WILLNER, 2017b). O isolamento social, por exemplo, é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo. O fator de imprevisibilidade, ou seja, a variação e aleatoriedade do horário de exposição e dos estressores, é utilizado a fim de evitar a habituação dos animais ao protocolo.

Assim, roedores submetidos a protocolos de estresse crônico normalmente são suscetíveis ao estresse e irão desenvolver comportamento tipo-anedônico – sintoma observado na clínica e relacionado à falta de interesse por atividade normalmente consideradas prazerosas – que caracteriza o comportamento tipo-depressivo esperado. Em roedores, o principal desfecho para avaliação desta alteração comportamental é o aumento do tempo de imobilidade em testes comportamentais de nado forçado e suspensão pela cauda. Porém, existe uma dificuldade de reproduzir o protocolo de estresse crônico entre laboratórios. Aparentemente, cerca de 75% dos pesquisadores, que utilizam e já publicaram resultados utilizando o modelo, afirmam que o mesmo seja reprodutível. Acredita-se que o êxito em replicar o modelo de estresse crônico dependa da diferença na suscetibilidade individual dos animais, da gravidade e imprevisibilidade dos estressores aplicados e da presença de um grupo controle confiável (EBNER; SINGEWALD, 2017; WILLNER, 2017b).

O racional deste modelo animal baseia-se no fato de que os estressores utilizados induzam um comprometimento da funcionalidade do eixo HPA, possivelmente em decorrência de alterações na translocação dos GR para o núcleo em células do sistema imune (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Esta condição resulta na resistência destas células à ação anti-inflamatória do cortisol (em roedores, a corticosterona) que pode ser resultado de elevados níveis inflamatórios, como descrito anteriormente. Na Tabela 3, estão descritos alguns achados de parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo, de estudos que utilizaram modelos de estresse crônico semelhantes ao empregado neste trabalho. Como esperado, a maioria dos estudos observa um aumento de parâmetros inflamatórios, redução de neurotrofinas e aumento de estresse oxidativo – principalmente pela redução de defesas antioxidantes. Ainda,

todos descrevem estas alterações no encéfalo, principalmente hipocampo, sem avaliação destes parâmetros no soro.

Considerando o que foi exposto, a associação da administração de LPS e do protocolo de estresse crônico vem sendo considerada (COUCH et al., 2016; ELGARF et al., 2014; XIA et al., 2018; YAN et al., 2017). O protocolo combinado permite mimetizar duas condições importantes para a etiologia e fisiopatologia do TDM, como o perfil inflamatório basal e a exposição a situações estressoras. Devido a ocorrência de variabilidade da resposta ao estresse crônico observada em roedores, a utilização de um protocolo combinado – que também foi utilizado neste trabalho – pode auxiliar no aumento da suscetibilidade do animal às condições impostas. Protocolos que utilizam este princípio indicam alterações comportamentais mais robustas, aumento de corticosterona e marcadores inflamatórios no soro e no encéfalo – citocinas e reatividade glial –, bem como a reversão destas alterações após o tratamento com antidepressivos (ELGARF et al., 2014; XIA et al., 2018; YAN et al., 2017). Um dos primeiros estudos que propôs este modelo, observou que a aplicação de doses repetidas de LPS (0,50 mg/kg i.p.) seguidas da exposição ao estresse crônico foi capaz de gerar redução do peso corporal e aumento dos níveis de corticosterona, bem como aumento do tempo de imobilidade no nado forçado e redução de comportamento social. No hipocampo destes animais foi observado um aumento da expressão de TNF α e GFAP, bem como diminuição da concentração de triptofano com aumento da razão quinurenina/triptofano. O tratamento com imipramina promoveu a reversão destas alterações (ELGARF et al., 2014). Este protocolo mimetiza dois mecanismos relacionados com a fisiopatologia dos transtornos de humor, que ainda estão relacionados à redução de plasticidade neuronal. Trata-se, portanto, de uma adaptação para tornar o modelo de estresse crônico mais robusto e melhorar a sua validade e reprodutibilidade entre estudos.

1.4.3 Modelo de hiperatividade induzida por anfetamina (AMPH)

O TB é um dos transtornos psiquiátricos mais complicado de ser mimetizado em um modelo animal, principalmente pelo aspecto de ciclagem dos episódios de humor (BEYER; FREUND, 2017). Por isso, muito do que é observado em modelos de TDM acaba sendo extrapolado para o TB. O fato do episódio de mania ser determinante para o diagnóstico de TB permite que modelos animais que mimetizem sintomas associados a este episódio sejam utiliza-

Tabela 3. Efeito do estresse crônico em parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo em roedores.

Autor (Ano) Espécie	Tempo de estresse crônico	Amostra biológica	Inflamação	Neurotrofinas	Estresse oxidativo
Song e cols. (2018) Rato	5 semanas	Hipocampo	↑ IL-1β, IFNγ, TNFα, COX-2, PGE2, Iba-1, GFAP	N/A	N/A
Wang et cols. (2018) Camundongo	3 semanas	Hipocampo	↑ IL-1β, IL-6, TNFα e COX-2	↓ BDNF	↑ MDA ↓ CAT
Fan e cols. (2018) Rato	5 semanas	Córtex pré-frontal	↑ IL-1β, TNFα, IL-6 e NFκB	↓ densidade de espinhos e sinapses	N/A
Wang e cols. (2017) Rato	2 semanas	Encéfalo	↔ IL-1β, IL-6, Iba-1	↔ BDNF	N/A
Li e cols. (2017) Camundongo	6 semanas	Hipocampo	↑ IL-1β, TNFα, pNFκB, NLRP3	↓ BDNF e NT-3	N/A
Luo e cols. (2017) Rato	6 semanas	Hipocampo	↑ IL-6, TNFα, PGE2 e COX-2	↓ BDNF	N/A
Jangra e cols. (2017) Camundongo	4 semanas	Hipocampo e córtex pré-frontal	↑ IL-1β e TNFα	↓ BDNF	↑ MDA ↓ GSH
Gawali e cols. (2017) Camundongo	4 semanas	Hipocampo	N/A	↓ BDNF	↑ MDA ↓ GSH
Bian e cols. (2012) Camundongo	40 dias	Hipocampo e córtex pré-frontal	↓ IL-1β ↑ Iba-1 e GFAP no hipocampo	↑ GDNF	N/A
You e cols. (2011) Rato	4 semanas	Hipocampo, córtex e baço	↑ TNFα ↑ IL-14 no hipocampo e córtex ↑ IL-1β no córtex	↓ BDNF e TGF-β	N/A

Abreviações: IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; N/A, não avaliado; MDA, malondealdeído; CAT, catalase; GSH, glutatona reduzida; COX, ciclo-oxigenase; NFκB, fator nuclear kappa B; IFN, interferon; Iba, proteína adaptadora de ligação de cálcio ionizado; GFAP, proteína glial fibrilar ácida; TGF, fator de crescimento transformador; PGE, prostaglandina E; NLR, receptor do tipo Nod.

dos para o estudo deste transtorno de humor (BEYER; FREUND, 2017; SHARMA et al., 2016). Assim, a administração de psicoestimulantes, como a anfetamina (AMPH), em animais de laboratório é um dos modelos animais de TB melhor aceito até o momento, por mimetizar o episódio de mania com validade de construto, face e preditiva.

A administração de AMPH (normalmente, d-anfetamina) promove um aumento na neurotransmissão dopaminérgica, o que gera hiperatividade em roedores, principal desfecho observado neste modelo animal e comportamento comparável ao que ocorre na clínica (BEYER; FREUND, 2017). Esta hiperatividade normalmente é quantificada pelo aumento da locomoção no teste de campo aberto. Evidências ainda sugerem que a retirada do psicoestimulante é capaz de resultar em comportamento tipo-depressivo (VALVASSORI et al., 2019). Estudos utilizando a administração crônica de AMPH (7 a 14 dias) reportam que há o aumento de parâmetros de estresse oxidativo (FREY et al., 2006b), diminuição de fatores neurotróficos (FREY et al., 2006c) e prejuízo das defesas antioxidantes (FREY et al., 2006a). Ainda, um aumento dos níveis de citocinas inflamatórias em ratos submetidos a administração de anfetamina já foi descrito (VALVASSORI et al., 2015). Na Tabela 4, estão resumidas as alterações inflamatórias, neurotróficas e oxidantes mais frequentes que são observadas em animais submetidos a administração de psicoestimulantes.

Ainda, o tratamento com estabilizadores de humor é capaz de reverter a maioria das alterações comportamentais e bioquímicas observadas em ratos administrados com AMPH (2 mg/kg) (FREY et al., 2006c, 2006d; VALVASSORI et al., 2015). Aparentemente, este modelo animal satisfaz todos os critérios das validades para um modelo animal de transtorno de humor, mais especificamente de TB. Porém, os desfechos observados ainda são considerados muito simples para complexidade que é observada na clínica (SHARMA et al., 2016). Além disso, a ausência de ciclagem espontânea de episódios de mania e depressão é considerada uma relevante limitação dos modelos animais de TB (importante para a validade de face) e um fenômeno de difícil, ou quase impossível, representação na pesquisa pré-clínica (vide Beyer e Freund 2017 para revisão dos modelos animais de TB).

Tabela 4. Efeito de diferentes psicoestimulantes em marcadores inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo em roedores.

Autor (Ano) Espécie	Psicoestimulante e dose	Amostra biológica	Inflamação	Neurotrofinas	Estresse oxidativo
Valvassori e cols. (2019) Rato	AMPH, 2 mg/kg/dia i.p., 14 dias	Córtex pré-frontal, hipocampo e estriado	N/A	↓ BDNF, GDNF e NGF ↑ NT-3 e NT-4	N/A
Hodes e cols. (2018) Camundongo	AMPH, 5 mg/kg, i.p., dose única	Hipocampo e córtex pré-frontal	N/A	N/A	↑ SOD, PC e TBARS ↓ CAT e GPx no hipocampo
Gomes e cols. (2017) Rato	Femproporex, 12,5 mg/kg/dia i.p, 14 dias.	Córtex pré-frontal, hipocampo e estriado	N/A	N/A	↑ MDA no hipocampo e estriado ↑ PC e ↓ SOD
Motaghinejad e cols. (2017) Rato	Metilfenidato 1-10 mg/kg i.p., 2x ao dia, 14 dias	Hipocampo	↑ IL-1β e TNFα	↓ BDNF	↑ MDA e CAT, ↓ SOD
Beirami e cols. (2017) Rato	Metanfetamina 10 mg/kg/dia i.p., 10 dias	Hipocampo	↑ TNFα, IL-6, COX-2, NFκB, GFAP e Iba-1	N/A	N/A
Gubert e cols. (2016) Camundongo	AMPH 2 mg/kg, ip., dose única	Córtex pré-frontal, hipocampo e estriado	↑ IL-1β no estriado ↔ TNFα e IL-6	N/A	↑ MDA no estriado
Gubert e cols. (2016) Camundongo	AMPH 2 mg/kg/dia ip., 7 dias	Córtex pré-frontal, hipocampo e estriado	↑ IL-1β no estriado ↔ TNFα e IL-6	↓ BDNF no córtex pré- frontal	↑ MDA no hipocampo
Fries e cols. (2015) Rato	AMPH, 2 mg/kg/dia i.p., 7 dias	Hipocampo, córtex pré- frontal e amígdala	N/A	↔ BDNF	N/A
Fries e cols. (2015) Rato	AMPH, 2 mg/kg/dia i.p., 35 dias	Hipocampo, córtex pré- frontal e amígdala	N/A	↓ BDNF no cortex pré- frontal	N/A
Valvassori e cols. (2015) Rato	AMPH, 2 mg/kg/dia i.p., 14 dias	Soro, CSF, hipocampo, córtex frontal e estriado	↑ IL-4, -6, -10 e TNFα no córtex frontal, estriado e soro	N/A	N/A

Abreviações: AMPH, anfetamina; IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; GDNF, fator neurotrófico derivado da glia; NT, neurotrofina; N/A, não avaliado; NGF, fator de crescimento neural; MDA, malondealdeído; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPx, glutatona peroxidase; COX, ciclo-oxigenase; NFκB, fator nuclear kappa B; PC, proteína carbonil; Iba, proteína adaptadora de ligação de cálcio ionizado; GFAP, proteína glial fibrilar ácida.

1.5 PERSPECTIVA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

De acordo com um dos maiores estudos clínicos conduzidos para avaliar a efetividade do tratamento farmacológico no TDM, menos de um terço dos pacientes apresentam remissão total de sintomas seguindo um protocolo padrão de tratamento com antidepressivos (DE SOUSA et al., 2015; TRIVEDI et al., 2006). Ainda, mesmo após a tentativa de dois tratamentos, a metade dos pacientes não apresentaram resolução dos sintomas e isso também é observado no TB, principalmente durante episódios depressivos (TRIVEDI et al., 2006). Essa evidência reforça que o simples aumento na disponibilidade de monoaminas não é suficiente para promover melhora em todos os indivíduos e sugere que os efeitos terapêuticos dos tratamentos atuais são decorrentes da modulação de outros mecanismos envolvidos na fisiopatologia dos transtornos de humor (CASTRÉN; ANTILA, 2017; DWIVEDI; ZHANG, 2015; LEE et al., 2018). Logo, ainda é necessário elucidar quais mecanismos devem ser modulados pelas terapias farmacológicas para que haja remissão dos sintomas de humor, bem como investigar novos alvos terapêuticos que possam contribuir para a eficácias dos tratamentos atuais.

1.5.1 Agonistas do receptor do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1)

Neste trabalho, propomos o redirecionamento de um fármaco agonista dos receptores de GLP-1 (GLP-1r), a exendina-4 ou exenatida (EX-4), já aprovado para o tratamento da diabetes, como adjuvante no tratamento dos transtornos de humor. O peptídeo natural, exendina-4, é composto por 39 aminoácidos e foi isolado da saliva de um lagarto *Heloderma suspectum* (ENG et al., 1992). Atualmente, a sua forma sintética, a exenatida, é comercializada para auxiliar no controle glicêmico de pacientes com diabetes mellitus tipo II (RUSSELL-JONES, 2010). Como o peptídeo endógeno, GLP-1, possui uma meia-vida curta, devido a ação da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), a troca de aminoácidos alanina por glicina na molécula permitem um aumento da meia-vida dos seus análogos sintéticos (MUSKIET et al., 2017).

Entre os efeitos terapêuticos da EX-4 estão a estimulação da secreção de insulina e inibição da secreção de glucagon pelo pâncreas, bem como o retardo do esvaziamento gástrico e a redução do apetite (VAN BLOEMENDAAL et al., 2014). Todos esses efeitos resultam da sua ação como potente agonista seletivo de GLP-1r em células pancreáticas. Curiosamente, este receptor também é expresso por células não pancreáticas, tais como neurônios, astrócitos,

microglia e células endoteliais, o que sugere que seus agonistas poderiam exercer efeitos neuroprotetores (ALVAREZ et al., 2005; CORK et al., 2015). Após a sua administração periférica, acredita-se que a disponibilidade de EX-4 no parênquima cerebral possa atingir 90%, indicando uma alta afinidade e capacidade de atravessar a BHE exercendo um efeito central (KASTIN; AKERSTROM, 2003).

Além da exenatida, outros análogos sintéticos do GLP-1 como a liraglutida, têm sido utilizados no tratamento do diabetes mellitus do tipo II e sugeridos no tratamento de pacientes deprimidos com comorbidades metabólicas (MCELROY, 2004). Estudos recentes apontam que a EX-4 promove diferenciação e previne degeneração neuronal, reduzindo danos causados por mecanismos excitotóxicos *in vivo* e *in vitro* (PERRY et al., 2002). Ainda, já foi observado que a EX-4 aumenta a função cognitiva e reduz comportamentos tipo-depressivos em roedores (DURING et al., 2003; ISACSON et al., 2011). Análises exploratórias de estudos clínicos recentes reforçam a relevância do uso destes agonistas de GLP-1r. Em pacientes com a doença de Parkinson, o tratamento com EX-4 por 48 semanas – associado à terapia usual – promoveu a melhora de escores de sintomas motores (ATHAUDA et al., 2017), bem como de não motores como o humor e bem-estar (ATHAUDA et al., 2018). Então, além do efeito hipoglicemiante da EX-4, esses achados indicam um efeito neuroprotetor, com potencial anti-inflamatório, da ativação dos GLP-1r (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2018). Tal efeito poderia auxiliar na busca de novos alvos para o tratamento dos transtornos de humor ou simplesmente melhora da resposta terapêutica. uma vez que o perfil inflamatório exacerbado contribui para a baixa responsividade ao tratamento nos transtornos de humor.

JUSTIFICATIVA

Os transtornos de humor são doenças mentais graves, de etiologia multifatorial e complexa, altamente incapacitante e de alta prevalência na sociedade. Estudos mais recentes sobre a fisiopatologia destes transtornos têm integrado a teoria monoaminérgica com a hipótese inflamatória-neurotrofinas-estresse oxidativo como uma nova abordagem no entendimento dos TDM e TB. Ainda, alterações nestes parâmetros parecem estar relacionadas a altas taxas de resistência ao tratamento com antidepressivos, ao qual apenas 50-70% dos pacientes respondem de forma satisfatória. Isto repercute diretamente na qualidade de vida destes indivíduos com aumento de sofrimento pessoal e sobre carga familiar além de gerar mais custos diretos e indiretos para a sociedade.

Portanto, a utilização e validação de modelos animais que representem melhor as manifestações clínicas são consideradas de grande valia para o progresso da pesquisa acerca dos transtornos de humor. A utilização destes modelos animais permite explorar a relação das alterações periféricas e centrais, o que muitas vezes não é possível na clínica. Além disso, é possível utilizar estes modelos animais para avaliação de novos fármacos, com potencial ação neuroprotetora, que possam ser capazes de auxiliar no tratamento da depressão, bem como melhorar a taxa de resposta terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações periféricas e centrais de parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo em modelos animais distintos que mimetizassem mecanismos etiológicos e fisiopatológicos dos transtornos de humor. Bem como investigar os efeitos neuroprotetores da EX-4, um agonista de GLP-1r, como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento dos transtornos mentais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos estão distribuídos em três experimentos independentes, mas complementares, que serão referidos conforme a ordem dos artigos científicos apresentados nesta tese.

No experimento do Artigo científico I, foi proposta a avaliação da utilização de um modelo animal de estresse crônico modificado, baseado em um protocolo combinado de administração de LPS seguida de um protocolo de estresse crônico, que tinha por finalidade:

- Analisar as possíveis alterações provocadas pelo protocolo combinado em parâmetros de anedonia e comportamento tipo-depressivo como peso corporal, *coat state*, consumo de sacarose, comportamento exploratório e nado forçado;
- Avaliar os efeitos em órgãos periféricos como a hipertrofia da glândula adrenal e do baço;
- Analisar as concentrações séricas de diferentes citocinas inflamatórias – como IL-10, IL-1 β , IFN γ , CCL11, IL-6 e TNF α –, BDNF e TBARS;
- Quantificar os níveis de BDNF e TBARS no hipocampo; e
- Avaliar as validades de construto e de face do modelo proposto para replicação em futuros trabalhos.

No Artigo científico II, um modelo animal de mania induzido por AMPH foi utilizado a fim de:

- Avaliar a utilização do mesmo como um modelo animal de ruptura da BHE;
- Corroborar o comportamento de hiperatividade observado neste modelo no campo aberto;

- Quantificar a expressão proteica de claudina-5, como marcador de alterações na permeabilidade da BHE no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo;
- Analisar as concentrações séricas de TNF α e TBARS, bem como seus níveis em regiões cerebrais como córtex pré-frontal, estriado e hipocampo; e
- Avaliar o efeito do tratamento com lítio nos parâmetros analisados nestes animais.

O experimento do Artigo científico III utiliza um modelo de inflamação aguda induzida por LPS com o intuito de:

- Avaliar os efeitos do tratamento agudo de diferentes doses de EX-4, um agonista GLP-1r, no *sickness behavior* (representado pelo comportamento exploratório, peso corporal e imobilidade); e
- Identificar se a EX-4 é capaz de exercer efeitos terapêuticos modulando as concentrações séricas e hipocâmpais de IL-6, BDNF e TBARS nestes mesmos animais.

3 ARTIGO CIENTÍFICO I

Artigo original intitulado “*Anhedonic-like behavior correlates with IFN γ serum levels in a two-hit model of depression*” em revisão na *Behavioural Brain Research*.

Anhedonic-like behavior correlates with IFN γ serum levels in a two-hit model of depression

Luiza P Géa^{a,b}, Rafael Colombo^c, Eduarda D da Rosa^{a,d}, Bárbara Antqueviezc^a, Érica Z de Aguiar^a, Gabriel Hizo^a, Gabriela Schmidt^a, Larissa F de Oliveira^a, Dirson Stein^{a,e}, Adriane R Rosa^{a,b,e,*}

^a Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500 – Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Laboratório de Farmacologia e Fisiologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – Caixas do Sul, RS, Brazil.

^d Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – Porto Alegre, RS, Brazil.

^e Programa de Pós-graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2400 – Porto Alegre, RS, Brazil.

Declaration of interest: none.

***Corresponding author**

Adriane Ribeiro Rosa, PharmD, PhD

Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350 – Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 33598845 / Fax: +55 51 33598846. E-mail: adrianerrosa@gmail.com

Abstract

Stress is implicated in the etiology of major depressive disorder (MDD) and leads to the activation of pro-inflammatory pathways, which are recognized to induce depressive symptoms. For instance, depression is commonly observed in patients with hepatitis C and cancer under IFN therapy. Also, high levels of inflammatory cytokines are described in the serum of individuals with MDD, which indicate a multi-system aspect of psychiatric disorders. Thus, we evaluated the effects of a two-hit model of depression in peripheral and CNS alterations on inflammatory, neurotrophic, and oxidative stress parameters and the behavior. Male Wistar rats were submitted to lipopolysaccharide (LPS) injections, followed by a chronic unpredictable mild stress (CUMS) protocol. Rats exposed to CUMS (CUMS+ groups) exhibited reduced body weight and sucrose consumption and preference and increased score of coat state and locomotor behavior. Interestingly, higher IFN γ serum levels were observed in the LPS/CUMS+ group, which were further correlated with reduced sucrose consumption. Hypertrophy of adrenal gland was also observed in CUMS+, and splenic hypertrophy was exclusive of LPS-injected animals. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels were decreased in the serum of CUMS+ animals, while no differences were found in the hippocampus and on lipid peroxidation levels. Besides corroborating the effectiveness of the CUMS model on inducing depressive-like behavior, our findings suggest that the combination of ethological and pathophysiological components of MDD may provide a more translational approach. Also, the correlation of increased IFN γ peripheral levels with an anhedonic-like phenotype reinforce the contemporary concept of psychiatric disorders being considered multi-system inflammatory diseases.

Keywords

Lipopolysaccharide; Chronic unpredictable mild stress; Inflammation; Interferon gamma; Anhedonic-like behavior; Major Depressive Disorder.

1 Introduction

Stress is known to be an important trigger and predictor of depressive episodes, independent of a genetic vulnerability [1] being relevant to major depressive disorder (MDD) etiology. MDD is a highly disabling mood disorder, which affects approximately 4.4% of adults and is associated with high rates of treatment resistance [2,3]. Individuals present with depressed mood, loss of interest or pleasure (anhedonia), sleep disturbances and poor cognitive function [4]. The mood symptoms are mainly attributed to reduced levels of monoamines in the central nervous system (CNS) [5]. Currently, it has been discussed that the monoaminergic hypothesis is no longer able to explain itself the pathophysiological mechanisms underlying the MDD.

For instance, immune system disturbances and inflammation have been constantly implicated in the MDD pathophysiology and non-responsiveness to antidepressant therapy [2,6,7]. Individuals with MDD exhibit high levels of inflammatory parameters in the serum including interleukin(IL)-6, IL-1 β , interferon (IFN) γ and tumor necrosis factor (TNF) α [8,9]. Most compelling evidence of inflammation implicating on depressive symptoms are described during IFN therapy in patients with hepatitis C and cancer [10,11]. IFN-induced MDD has been observed in almost half of the patients under a 12-week IFN α therapy, while concomitant use of antidepressant reduced this incidence [12]. Among the common symptoms reported after IFN therapy includes fatigue, anorexia, depressed mood, anxiety, and cognitive dysfunction – which is exhibited by 25-80% of the patients and resembles the sickness-behavior also induced in animal models [10,13]. IFN therapy has also been shown to increase serum levels of IL-6 and TNF α , as well as disrupt the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis – which is responsible for the stress response [14,15].

These increased levels of peripheral proinflammatory cytokines are usually accompanied by reduced levels of neurotrophins, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and increased levels of oxidative stress in the serum of patients [6,16]. Oxidative stress is known to be a mediator and a product of the inflammatory response, and neuroplasticity and neurogenesis are also disrupted by the increase of inflammation in the CNS [17]. The low-grade chronic inflammation commonly attributed to

mood disorders [18,19] may be challenging to mimic in animal models without causing significant injuries. This inflammatory state is systemic which corroborates the hypothesis of psychiatric disorders, such as MDD, being considered multi-system inflammatory diseases. Thus, it is possible to assume that inflammation plays a central role in the complex interrelation of biological processes involved in the pathophysiology of MDD. In this study, we aimed to evaluate the effect of a two-hit animal model of depression in peripheral and CNS biochemical parameters as well as its impact on the behavior. By using a combination of lipopolysaccharide (LPS) injections and chronic stress exposure, we sought to integrate a pathophysiological component (inflammation) with an etiological environmental component (chronic stress exposure) considering that this two-hit model would better mimic MDD pathophysiology.

2 Material and methods

2.1 Animals

Forty-six Wistar rats (from *Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório* – CREAL, Porto Alegre, Brazil), weighing ± 300 g and two months old, with free access to water and food and a 12-h light/dark cycle. The animals were randomly allocated to obtain a similar average weight among cages and groups, and the protocol was replicated three times. All animals were housed in individually ventilated cages. From the beginning, non-stressed animals were housed 2-3 per cage, while stressed rats were isolated [20]. This study was approved by the institutional animal ethics committee from the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA, #16-0488) and all experimental procedures were performed in accordance with national (DBCA n° 30/2016 – CONCEA, 2016) and international (Guide for the care and use of laboratory animals – NIH, 2011) ethical guidelines.

2.2 Treatments and CUMS protocol

The protocol included the first hit with LPS followed by the chronic unpredictable mild stress (CUMS) protocol (adapted from Elgarf et al., 2014). First, animals were submitted to four injections of LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (L2630, Sigma-Aldrich®) at 0.25 mg/kg (diluted in saline at 1 mg/mL) or saline intraperitoneally (i.p.) each other day during one week.

After that, animals from stressed groups (CUMS+) were submitted to the CUMS protocol adapted from Cai et al. (2015) and Elgarf et al. (2014) during 6 weeks. Seven different stressors were randomly organized each week to avoid habituation: water deprivation (24 h), food deprivation (24 h), forced warm swim at 30°C (30 min), forced cool swim at 8°C (5 min), tail pinch (1 min, 1 cm from the tip of the tail), soiled bedding (24 h, 200 mL water), and restraint (2 h). Stressors were performed during the morning at different time points each day, but consistently between 9:00 am and 12:00 pm. So, animals were distributed into four groups: SAL/CUMS- (n=8), SAL/CUMS+ (n=15), LPS/CUMS- (n=9) and LPS/CUMS+ (n=14) (Figure 1).

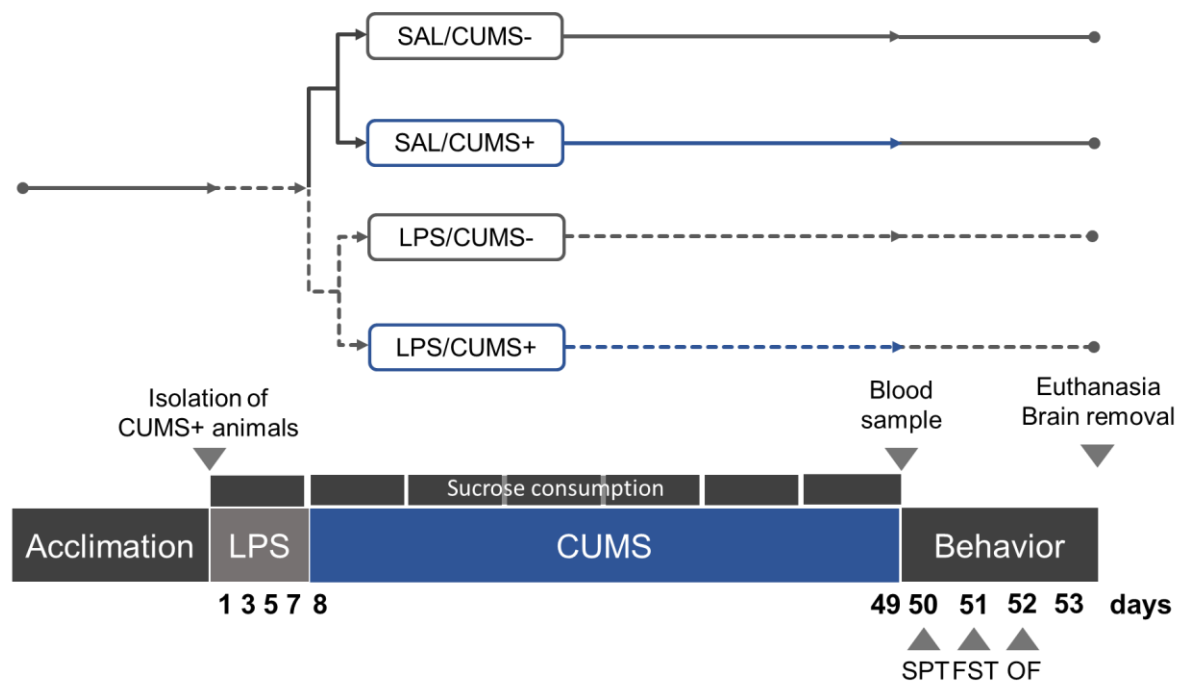


Figure 1. Experimental design of the two-hit model of depression. From the beginning and after acclimation, animals from CUMS+ groups were isolated (n=1 per cage). On the first week, animals from the LPS groups (represented by the dashed line) received four LPS i.p. injections (on days 1, 3, 5, and

7). On day 8, CUMS+ animals were submitted to the chronic stress protocol for 6 weeks. After the last stressor, blood samples were collected from all animals. From day 50 to 52, behavioral was assessed, followed by euthanasia on day 53. Sucrose consumption was also evaluated weekly. SAL, saline; LPS, lipopolysaccharide; CUMS, chronic unpredictable mild stress; SPT, sucrose preference test; FST, forced swim test; OF, open field.

2.3 Body weight and coat state

From day 0, the body weight and coat state of each animal was registered once per week. Body weight (g) were analyzed as the difference between last and first assessments (indicated by Δ). The coat state of six different parts of the body was evaluated: head, neck, dorsal coat, ventral coat, forepaws, hind paws and genital. Two researchers graded the coat state as 0.0, 0.5 or 1.0 for each area and the total score of each week was defined by the sum of the scores for each body area, as described previously by Nollet et al. (2013). Higher scores relate to worst coat conditions and poor self-care behavior.

2.4 Blood sample

On week 7, blood was collected (9:00 am) without anesthesia to avoid interference with inflammatory parameters. Rats were gently restraint, and 0.5 mL of blood was collected from the lateral tail vein. Samples were immediately centrifuged (2057g, for 10 min, at room temperature) and the serum was stored at -80°C until further analysis.

2.5 Behavioral assessment

Behavior was assessed during week 7 between 9:00 am and 1:00 pm. All procedures were recorded with a webcam (C270 HD, Logitech) and the software ANY-maze 5.2 was used for later analysis.

2.5.1 Sucrose consumption

Anhedonia is a classic symptom of depression, characterized by lack or diminished interest for pleasant activities [4]. Before the test, animals were deprived of water for 15 h. At the day of the test, rats were individualized in clean cages and allowed to habituate to the room for 1 h. After that, two bottles were provided – one filled with sucrose 1.2% (diluted in the drinking water) and another one with drinking water [20]. Animals were allowed to drink from both bottles for 1 h. By weighing the bottles before and after the test, sucrose consumption (g) and preference (%) were determined. Preference was calculated by $[\text{sucrose consumption} / (\text{sucrose} + \text{water consumption})] \times 100$. Additionally, sucrose consumption was evaluated every week.

2.5.2 Forced swim test (FST)

All animals were submitted to the training and test sessions of the forced swim test (FST), respectively. The FST apparatus consisted of a 50-cm high cylinder with 25-cm-diameter filled with water (up to 30 cm, at 23-25°C) [24]. During the training session, all rats were positioned in the water and able to habituate to the water temperature and apparatus for 15 min. After that, each animal was completely dried and returned to their cages. After 24h, the same occurred during the test, but it lasted 5 min. The depressive-like behavior analysis consisted of using scores for three different behavior such as swimming, immobility, and climbing during the test. At every 5-s period, a score was registered to the predominant behavior until the end of the test when each animal totalized 60 scores.

2.5.3 Open field (OF)

Spontaneous locomotor activity and anxiety-like behavior were assessed using the OF. The apparatus consisted of a round arena of 78-cm diameter with a 36-cm high wall and black floor divided into 25 spaces, as previously described. All animals were placed in the center of the arena and allowed

to explore the apparatus for 5 min. The frequency of crossings, average speed and time in the periphery were evaluated.

2.6 Euthanasia and tissue samples

Animals were decapitated, and the brain was removed as quickly as possible, and the hippocampus was dissected, weighed and stored at -80°C until biochemical analysis. Also, the spleen and adrenal gland were removed and weighed. The weight of the hippocampus, adrenal gland and spleen (g) of each animal were normalized by the respective body weight (g).

2.7 Biochemical analysis

Each hippocampus was manually homogenized with cold protease inhibitor mix (80650123, GE Healthcare Life Sciences) diluted in phosphate buffered saline (PBS) at an approximately 1:8 (w/v) ratio. Then, samples were centrifuged (2057g, for 10 min, at 4°C) and the supernatants were collected and used for the biochemical assays. Both hippocampus homogenates and serum samples were allowed to thaw at room temperature previous to each assay.

2.7.1 Total protein

For the hippocampus homogenates, samples were diluted in PBS at 1:15 (v/v) and the total protein was measured by Bradford's method (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, 5000006, Bio-Rad Laboratories, Inc.). The standard procedure for microplates was performed using bovine serum albumin (BSA, A7906, Sigma-Aldrich[®]) as the protein standard according to the manufacturer's protocol.

2.7.2 Inflammatory cytokines

Inflammatory cytokines in the serum samples were assessed using the Milliplex[®] Map Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel kit (RECYTMAG-65K, EMD Millipore). Seven different cytokines – TNF α , IL-1 β , C-C motif chemokine (CCL) 11, IL-6, IL-10, IFN γ , and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 – were quantified using Luminex[®] xMAP[®] technology according to the manufacturer's instructions of the kit.

2.7.3 BDNF

BDNF levels were measured using a sandwich ELISA kit (ChemiKine[™] CYT306, Chemicon[®]) according to the manufacturer's instructions. Serum and homogenates samples were diluted 1:200 (v/v) and 1:3 (v/v), respectively, in sample diluent. Standards and samples were tilted and incubated in the plate and diluted biotinylated mouse anti-BDNF monoclonal detection antibody was added. After washing, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate, substrate and stop solutions were added, and the BDNF concentration (pg/mL) was determined by absorbance at 450 nm.

2.7.4 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

For oxidative stress, we measured the levels of TBARS which is directly related to the lipid peroxidation and expressed by malondialdehyde (MDA) formation. The samples were mixed with SDS solution and the color reagent containing thiobarbituric acid (TBA, 10009055, Cayman Chemical). After heated for 1 h, all samples were immediately placed in ice to stop the reaction and centrifuged (1600g, for 10 min, at 4°C). The supernatants were collected, and the TBARS levels (μ M) were determined by the absorbance at 535 nm. The assay was performed according to the manufacturer's protocol.

2.8 Statistical analysis

The normality of the distribution and the homogeneity of variance were assessed by the Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. Comparison of means was performed using two-way analysis of variance (ANOVA) – using the two components of the model as independent factors (LPS - factor 1, CUMS - factor 2 and LPS*CUMS - interaction. Whenever two-way ANOVA indicated a significant interaction of factors Tukey post hoc test was performed. Sucrose consumption was also analyzed using repeated measures ANOVA followed by multiple comparisons adjusted by Bonferroni correction. Correlations were performed using Pearson's correlation test. Outliers for sucrose consumption, an important behavioral outcome for reproducibility of the chronic stress protocol, were determined by the Grubbs' test considering alpha equals 0.05 and excluded from all analyses (n=2). Overall, data are expressed as mean±SEM and two-tailed $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

3 Results

3.1 CUMS impaired body weight gain and induced poor self-care

At the end of the experiment, CUMS+ animals presented with reduced body weight when compared to the first assessment, given by Δ . Two-way ANOVA indicated a main effect of CUMS ($F_{1,42}=61.73$, $p < 0.001$) (Figure 2A). No main effects were observed for LPS ($F_{1,42}=0.62$, $p=0.804$) and its interaction with CUMS ($F_{1,42}=0.52$, $p=0.821$).

As expected, CUMS+ animals exhibited higher scores of coat state after the last week of stress. Two-way ANOVA indicated a main effect of CUMS ($F_{1,42}=285.39$, $p < 0.001$) and interaction of factors ($F_{1,42}=6.66$, $p=0.013$), but no main effect for the LPS ($F_{1,42}=0.90$, $p=0.348$) (Figure 2B). Both SAL/CUMS+ and LPS/CUMS+ were different from CUMS- groups according to post hoc analysis (all $p < 0.001$).

3.2 CUMS induced hypertrophy of the adrenal gland, while LPS injection was sufficient to promote splenic hypertrophy

CUMS+ groups exhibited increased adrenal gland weight (Figure 2C). Two-way ANOVA showed a main effect of CUMS ($F_{1,42}=18.45$, $p<0.001$), and no main effects for LPS and interaction of factors ($F_{1,42}=3.13$, $p=0.084$, and $F_{1,42}=1.31$, $p=0.259$, respectively). Interestingly, increased splenic weight was observed in the LPS-injected animals (Figure 2D). Thus, two-way ANOVA results indicated a main effect of LPS ($F_{1,41}=13.98$, $p=0.001$), with no main effects for CUMS and interaction ($F_{1,41}=0.01$, $p=0.910$, and $F_{1,41}=0.36$, $p=0.553$, respectively). One spleen was not removed intact being excluded for this variable (SAL/CUMS+, $n=14$).

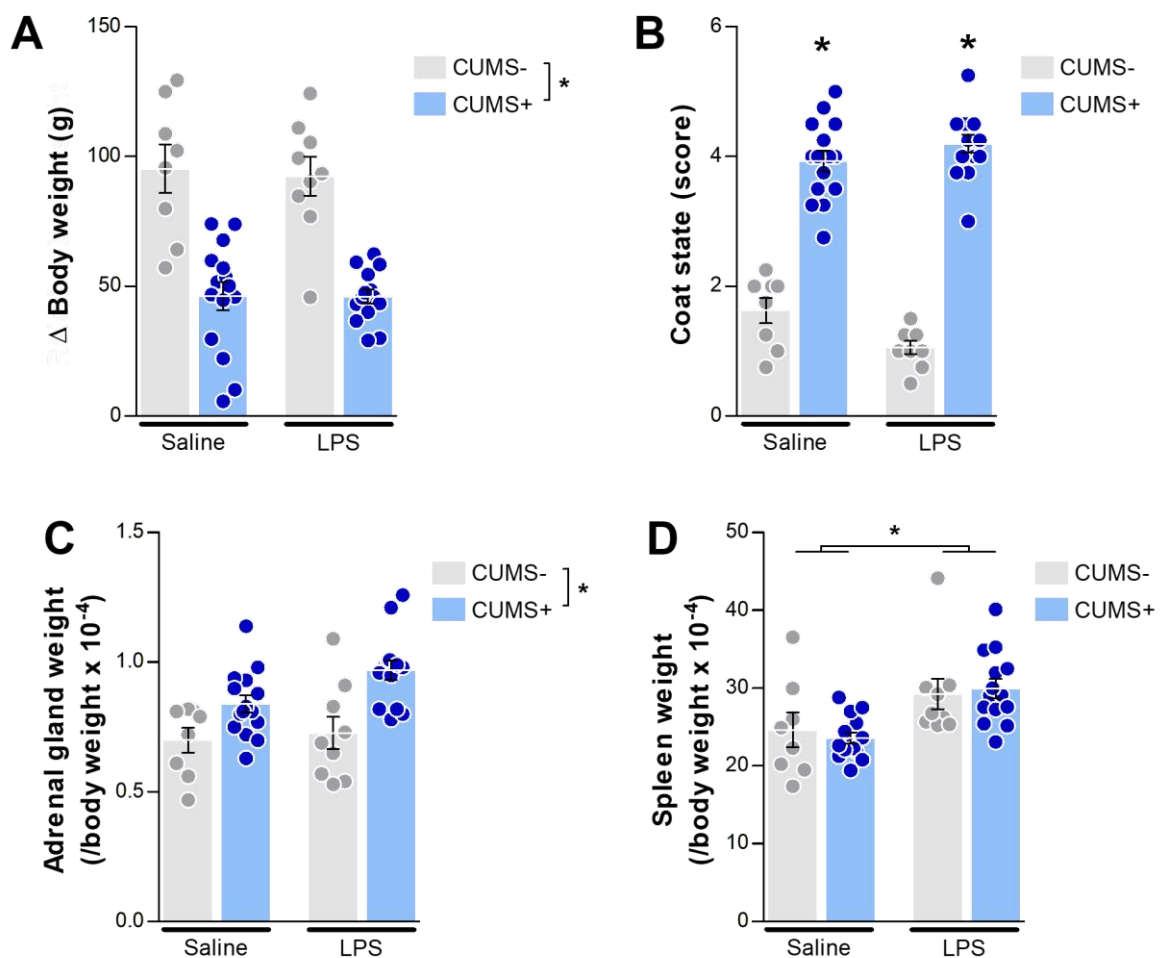


Figure 2. Effects of LPS-CUMS protocol on body weight, coat state, and adrenal and spleen weight. **A.** CUMS+ animals exhibited a reduced gain of body weight given by a reduced value of Δ (main effect

of CUMS, $*p < 0.001$). **B.** On day 53, coat state scores were higher in the CUMS+ animals ($*p < 0.001$ compared to SAL/CUMS- and LPS/CUMS-). **C.** Adrenal gland weight was increased in CUMS+ groups (main effect of CUMS, $*p < 0.001$). **D.** LPS led to an increase of splenic weight, which was not affected by CUMS (main effect of LPS, $*p = 0.001$). Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc (where applicable), and data expressed by mean \pm SEM.

3.3 Anhedonic-like behavior was dependent on CUMS exposure

In the last week (week 8), CUMS+ groups presented with reduced sucrose consumption and preference. For both variables, two-way ANOVA indicated a main effect of CUMS (consumption, $F_{1,42} = 24.50$, $p < 0.001$; and preference, $F_{1,42} = 7.48$, $p = 0.009$), but not for LPS (consumption, $F_{1,42} = 1.65$, $p = 0.205$; and preference, $F_{1,42} = 0.19$, $p = 0.666$) and interaction of factors (consumption, $F_{1,42} = 1.38$, $p = 0.247$; and preference, $F_{1,42} = 0.08$, $p = 0.777$) (Figures 3A and B).

Also, a follow-up on sucrose consumption from week 1 to 7 is provided (Supplementary figure). Repeated measures ANOVA indicated differences in sucrose consumption among weeks following LPS-CUMS protocol ($F_{6,252} = 6.62$, $p < 0.001$). Pairwise comparisons indicated that on week 6 sucrose preference reduced significantly in LPS/CUMS- ($p = 0.012$ compared to week 2) and LPS/CUMS+ groups ($p = 0.035$ compared to week 4).

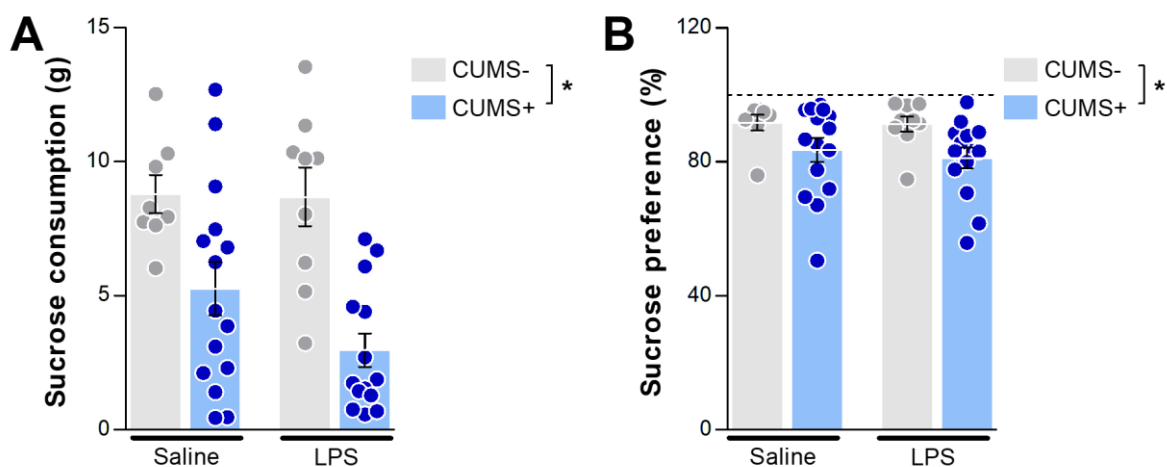


Figure 3. Evaluation of anhedonic-like behavior after LPS-CUMS exposure. **A.** CUMS+ groups exhibited a reduced consumption of sucrose compared to non-stressed animals (main effect of CUMS,

* $p < 0.001$). **B.** Sucrose preference was also reduced in the CUMS+ animals (main effect of CUMS, * $p < 0.001$). The dashed line indicates 100% of preference. Two-way ANOVA, and data expressed by mean \pm SEM.

3.4 CUMS increased overall locomotor activity and induced an anxiety-like behavior

Regarding overall spontaneous locomotor activity, CUMS+ animals exhibited hyperactivity indicated by the increased frequency of crossings and average speed (Figure 4A and B). Two-way ANOVA indicated a main effect of CUMS (crossing, $F_{1,42}=11.95$, $p=0.001$; and speed, $F_{1,42}=11.28$, $p=0.002$), but not for LPS (crossing, $F_{1,42}=0.05$, $p=0.830$; and speed, $F_{1,42}=0.76$, $p=0.388$) and interaction of factors (crossing, $F_{1,42}=0.31$, $p=0.582$; and speed, $F_{1,42}=0.32$, $p=0.572$). CUMS+ animals also exhibited an anxiety-like behavior by spending more time in the periphery of the OF apparatus (Figure 4C). Two-way ANOVA indicated by a main effect of CUMS ($F_{1,42}=4.32$, $p=0.044$), while no main effects were observed for LPS ($F_{1,42}=0.69$, $p=0.412$) and interaction of factors ($F_{1,44}=0.31$, $p=0.582$).

In the FST, immobility scores were not different among groups (Figure 4D). Two-way ANOVA did not exhibit main effects for the factors analyzed and interaction for immobility (LPS, $F_{1,42}=0.93$, $p=0.340$; CUMS, $F_{1,42}=1.86$, $p=0.180$; and LPS*CUMS, $F_{1,42}=1.32$, $p=0.258$) and swimming (LPS, $F_{1,42}=0.39$, $p=0.538$; CUMS, $F_{1,42}=0.10$, $p=0.756$; and LPS*CUMS, $F_{1,42}=0.68$, $p=0.414$). CUMS+ groups had lower climbing scores indicated by a main effect for CUMS ($F_{1,42}=27.17$, $p < 0.001$), but it was not accompanied by main effects of LPS and interaction of factors ($F_{1,42}=3.30$, $p=0.077$; and $F_{1,42}=3.07$, $p=0.087$, respectively). Swimming and climbing data are presented in the Supplementary table.

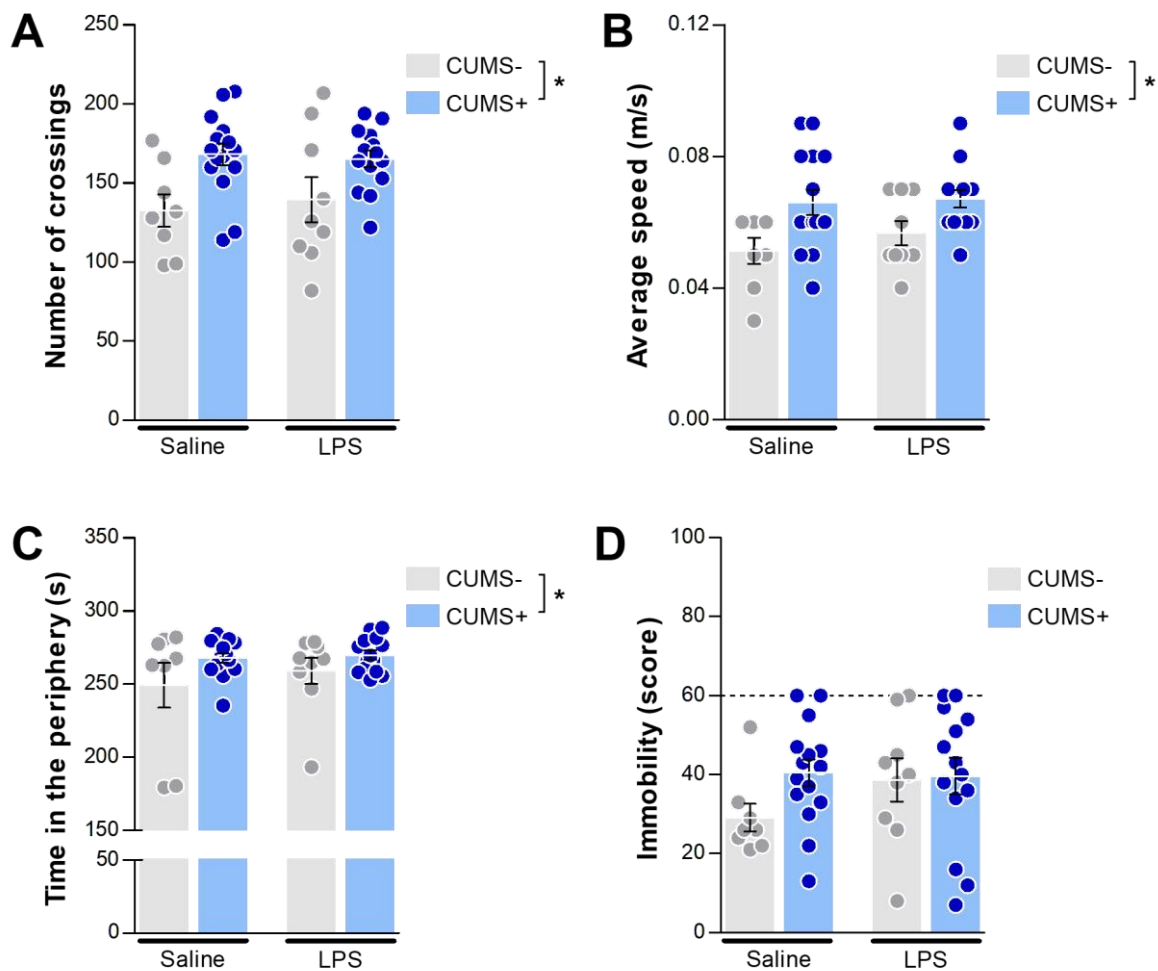


Figure 4. Effect of LPS-CUMS on locomotor activity in the OF and immobility in the FST. **A-C.** CUMS+ animals exhibited an increased frequency of crossings, average speed and time spent in the periphery regardless of LPS injection (main effect of CUMS, $*p < 0.05$). **D.** All groups seemed to present with increased immobility score compared to SAL/CUMS- group, but it was not significant. Two-way ANOVA, and data expressed by mean \pm SEM.

3.5 LPS/CUMS+ induced peripheral inflammation which was further correlated with anhedonic-like behavior

IFN γ and CCL11 were detected in the serum of all animals, while the levels of the other cytokines were below the limit of detection. IFN γ serum levels were increased by CUMS exposure, but the LPS/CUMS+ group presented with a higher level (Figure 5A). Two-way ANOVA indicated a main

effect of CUMS ($F_{1,42}=5.79$, $p=0.021$) and interaction of factors ($F_{1,42}=4.77$, $p=0.035$), without main effect for LPS ($F_{1,42}=0.12$, $p=0.730$). $IFN\gamma$ serum levels of the LPS/CUMS+ group were found to be significantly different from LPS/CUMS- group ($p=0.011$) after post hoc analysis. Interestingly, a significant moderate and negative correlation was identified between $IFN\gamma$ serum levels and both sucrose consumption ($r= -0.64$, $p=0.013$, Figure 6A) and preference ($r= -0.66$, $p=0.010$, Figure 6B) in the LPS/CUMS+ group. No significant correlation was found in the other groups for sucrose consumption (SAL/CUMS-, $r= 0.58$ and $p=0.128$; SAL/CUMS+, $r= -0.05$ and $p=0.876$; LPS/CUMS-, $r= 0.41$ and $p=0.273$) and preference (SAL/CUMS-, $r= -0.32$ and $p=0.442$; SAL/CUMS+, $r= 0.02$ and $p=0.953$; LPS/CUMS-, $r= -0.66$ and $p=0.052$). CCL11 levels did not differ among groups (Figure 5B). There was no indication of main effects following two-way ANOVA for LPS ($F_{1,42}=1.51$, $p=0.226$), CUMS ($F_{1,42}=2.69$, $p=0.109$) and interaction of factors ($F_{1,42}=0.01$, $p=0.907$).

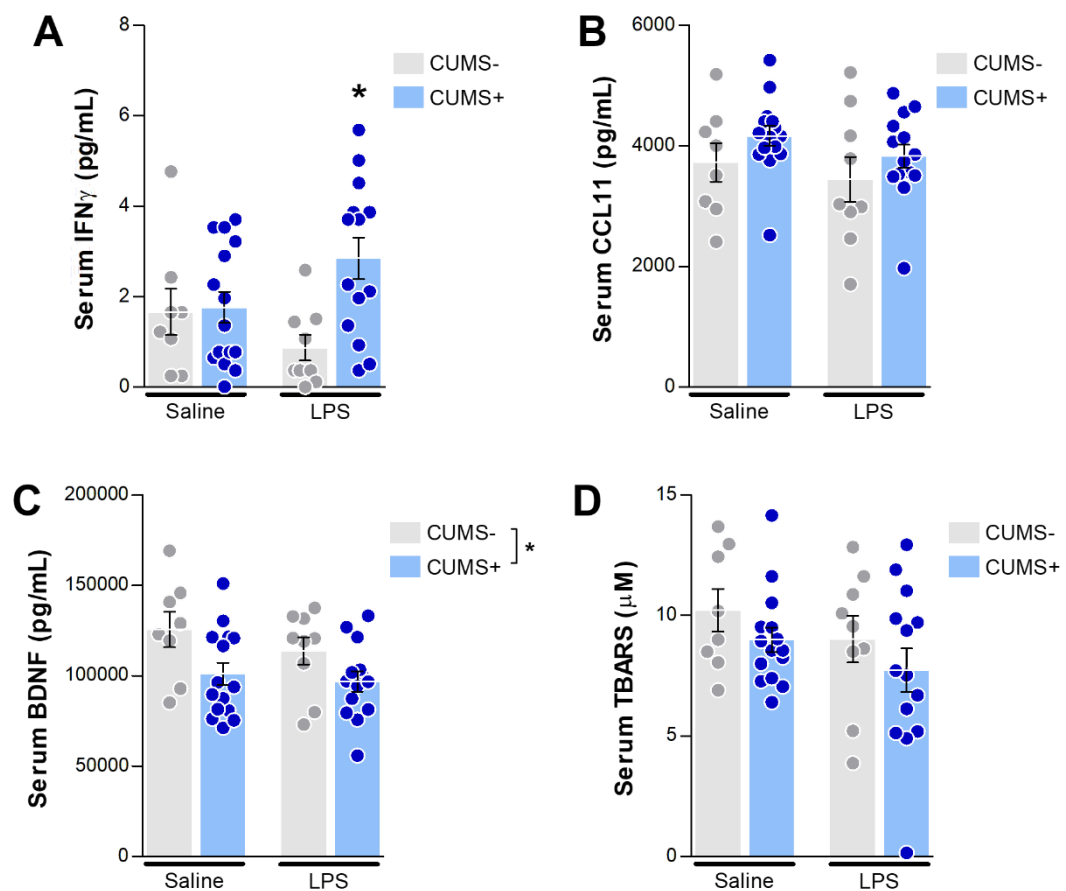


Figure 5. Effect of LPS-CUMS on peripheral inflammation, BDNF, and TBARS levels. **A-B.** $IFN\gamma$ serum levels were higher in the LPS/CUMS+ (* $p=0.011$ compared to LPS/CUMS-), while CCL11

serum levels were similar among groups. **C.** CUMS exposure reduced BDNF levels in the serum (main effect of CUMS, $*p=0.006$). **D.** No differences were observed regarding TBARS serum levels. Two-way ANOVA followed by Tukey post hoc (where applicable), and data expressed by mean \pm SEM. IFN, interferon; CCL11, C-C motif chemokine 11; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

3.6 CUMS was sufficient to reduce BDNF levels only in the serum, which was not accompanied by changes in TBARS levels

BDNF serum levels were lower in the CUMS+ (Figure 5C). Two-way ANOVA indicated a main effect of CUMS for BDNF serum levels ($F_{1,42}=8.32$, $p=0.006$), while no main effects were observed for LPS ($F_{1,42}=1.27$, $p=0.265$) and interaction of factors ($F_{1,42}=0.29$, $p=0.591$). TBARS serum levels did not differ among groups and no main effects of factors were observed (LPS, $F_{1,42}=2.13$, $p=0.152$; CUMS, $F_{1,42}=2.26$, $p=0.141$; and interaction, $F_{1,42}=0.01$, $p=0.972$) (Figure 5D).

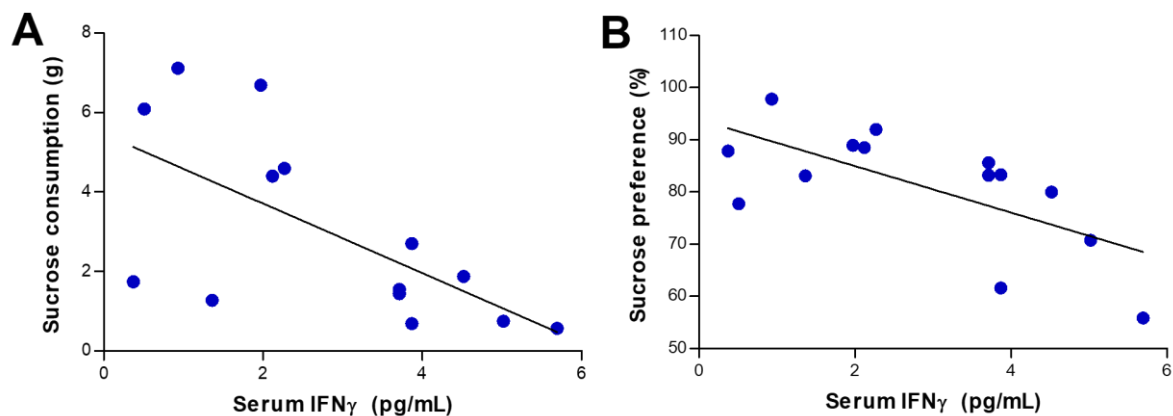


Figure 6. Correlation between IFN γ serum levels and anhedonic-like behavior in the LPS/CUMS+ group. **A.** Correlation between IFN γ serum levels and sucrose consumption. Pearson's correlation, coefficient $\rho = -0.64$, $p=0.013$. **B.** Correlation between IFN γ serum levels and sucrose preference. Pearson's correlation, coefficient $\rho = -0.66$, $p=0.010$. No significant correlations were found in the other groups. IFN, interferon.

3.7 LPS-CUMS exposure did not affect hippocampal BDNF and TBARS levels

Regarding BDNF hippocampal levels, there were no significant main effects for LPS ($F_{1,24}=0.60$, $p=0.448$), CUMS ($F_{1,24}=2.38$, $p=0.136$) and interaction of factors ($F_{1,24}=0.16$, $p=0.692$) (Table 1). Also, two-way ANOVA did not indicate main effects for any factors regarding hippocampal TBARS levels (LPS, $F_{1,23}=0.02$, $p=0.898$; CUMS, $F_{1,23}=0.03$, $p=0.876$; and interaction, $F_{1,23}=0.16$, $p=0.690$) and hippocampal weight (LPS, $F_{1,24}=0.13$, $p=0.719$; CUMS, $F_{1,24}=0.27$, $p=0.611$; and interaction, $F_{1,24}=0.13$, $p=0.724$) (Table 1).

Table 1. Hippocampal BDNF and TBARS levels and weight following LPS-CUMS exposure.

Group	BDNF (pg/mg total protein)	TBARS** (μ M/mg total protein)	Hippocampal weight (/body weight)	n
SAL/CUMS-	115.77 \pm 6.85	0.71 \pm 0.22	0.0610 \pm 0.0042	5
SAL/CUMS+	130.99 \pm 14.65	0.75 \pm 0.13	0.0578 \pm 0.0035	9
LPS/CUMS-	120.71 \pm 26.24	0.75 \pm 0.19	0.0583 \pm 0.0038	6
LPS/CUMS+	146.66 \pm 35.00	0.66 \pm 0.11	0.0578 \pm 0.0030	8

Two-way ANOVA, data expressed by mean \pm SEM, all $p>0.05$. **LPS/CUMS- group (n=5). BDNF, brain-derived neurotrophic factor; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

4 Discussion

The purpose of the present study was to evaluate the effect of a two-hit animal model of depression in peripheral and CNS biochemical parameters as well as its impact on the behavior. The rationale behind our two-hit animal model of depression, using LPS and chronic stress exposure, is based on the fact that MDD consists of a combination of environmental component and inflammation.

As expected, rats submitted to the CUMS protocol (CUMS+) exhibited depressive-like behavior – as a result of reduced body weight and sucrose consumption and preference, as well as increased coat

state scores – and anxiety-like behavior – given by the increased time spent in the periphery of the OF. In agreement with previous studies, our data highlights the face validity of the CUMS model [25–29]. Chronic stress is known to promote a disruption of the HPA axis, usually indicated by increased levels of corticosterone in the serum of rodents [28,30]. Thus, hypertrophy of the adrenal gland was observed in both CUMS+ groups, regardless of LPS injections. It has been reported that individuals with MDD exhibit hyperactivation of the HPA axis, which ultimately results in increased levels of cortisol [31]. Hence, stress is known to upregulate inflammatory pathways [32]. Nuclear factor kappa B (NFκB) and glucocorticoids receptors (GR) modulates each other expression, and an imbalance on GR-NFκB interaction can result in stress-induced inflammation [33].

Interestingly, we observed that animals submitted to the combined protocol (LPS/CUMS+) exhibited higher levels of IFN γ in the serum, which was further correlated with reduced sucrose consumption. Other proinflammatory cytokines were not detected, and CCL11 levels were not different among groups. Classically, IFN γ is known to mediate host immune response against pathogens being used as a treatment for hepatitis C virus infection and cancer [34]. However, patients under IFN therapy commonly exhibit depressive symptoms [10,11]. The role of IFN γ in MDD pathophysiology is thought to be related to its ability in inducing indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity [35,36]. IDO, expressed in peripheral macrophages and microglia, is the rate-limiting enzyme of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism, which is the primary precursor in the synthesis of serotonin. By upregulating IDO, IFN γ contributes to the depletion of tryptophan and reduction of serotonin levels that ultimately results in the depressive symptoms exhibited by individuals with MDD, as well as the anhedonic-like behavior observed exclusively in LPS/CUMS+ rats. This evidence suggests a possible role of IFN γ in mediating the communication between periphery and CNS, but further studies are required to investigate the supposed mechanisms involved.

Curiously, animals injected with LPS displayed hypertrophy of the spleen regardless of CUMS exposure, indicating that molecular alterations related to inflammatory priming may persist even after six weeks of stress exposure [37]. Chronic stress per se has been already described to induce splenic morphological alterations in rats [38]. The spleen is one of the major lymphoid organs, mainly composed of lymphocytes and macrophages being considered an essential reservoir of monocytes [39]. Thus, it is

responsible for blood filtration and host defense against pathogens, as previously observed in LPS injected mice [40]. Following bacterial and virus infection, the spleen also produces IFN [41]. Under some pathological circumstances, it has been reported that splenic monocytes reach the bloodstream and accumulate in injured sites differentiating into macrophages [39,42]. Thus, the combination of LPS injections and chronic stress exposure seemed to contribute to the activation and proliferation of monocytes and macrophages, characterized by cell migration and the release of IFN γ , which could explain the splenic hypertrophy observed. So far, our findings support the conceptualization of psychiatric disorders as a multi-system inflammatory disease [43].

Furthermore, CUMS+ groups presented with reduced BDNF serum levels. Thus, decreased peripheral levels of BDNF is consistently reported in individuals with MDD [16], and it is known to be restored by antidepressants [44]. In contrast with previous findings [45,46], hippocampal levels of BDNF were not reduced following LPS and CUMS exposure. It is possible that stressed animals were able to recover since the last stressor until hippocampal removal (1 week) [47] or that anhedonic-like behavior induced by CUMS may not be dependent on changes in CNS BDNF levels [48]. Therefore, the use of more intense stress protocols should be considered to induce long-lasting changes in neuroplasticity. Regarding the oxidative stress, we found similar peripheral and hippocampal TBARS levels across all groups, as demonstrated by Lucca et al. [49]. Considering that TBARS levels represent a lipid peroxidation marker, unaltered levels may represent a possible adaptation and compensatory mechanism of the antioxidant system [50]. However, increased oxidative stress has been described in MDD [51], and preclinical models [52], and possibly other markers could be altered following our LPS/CUMS protocol.

Some limitations should be acknowledged to our study in order to improve future investigations. First, the coat state was assessed blindly for LPS treatment but not for CUMS exposure. Second, we did not assess stress susceptibility and resilience in stressed animals which may contribute to the high intragroup variability and lack of statistical significance in some of the variables analyzed, such as immobility in the FST. Third, stressors were performed once per day, and this may contribute to the lack of significance among groups in the behavior parameters. Thus, the CUMS protocol may be adapted in

future studies. Forth, peripheral inflammatory cytokines measurement is still a challenge in rodents. The detection of 2 (IFN γ and CCL11) out of a 7-cytokine panel reflected our struggle on evaluating inflammatory alterations in this model. Moreover, the quantification of one oxidative stress marker was not sufficient to observe the effect of the proposed protocol in this parameter.

In summary, besides corroborating the influence and effectiveness of the CUMS model on inducing depressive-like behavior, our study suggests that the combination of ethological and pathophysiological components of MDD may provide a more translational animal model. Thus, initial priming with LPS followed by chronic stress exposure may be a useful tool for the development of new therapies with either anti-inflammatory and antidepressant potential. Altogether, our findings provide with insights on improving animal models of depression and support the contemporary concept of psychiatric disorders, such as MDD, being considered multi-system inflammatory diseases.

Acknowledgements

LPG is a scholarship recipient from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES). GH and LFO are scholarship recipient from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). EZA is a scholarship recipient from the Foundation for Research of the State of Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Funding

This work was supported by the Research Incentive Fund of HCPA [project number 16-0488]. The authors declare that the funding source had no further role in the study design; analysis, and interpretation of data; and in writing and submitting the manuscript for publication.

Author's contributions

LPG, RC, and ARR designed and wrote the protocol. LPG, RC, EDR, BA, EZA, GH, GS, LFO, and DS performed the LPS-CUMS protocol, behavior, and euthanasia. LPG, EDR, BA, and LFO carried

out biochemical analysis. LPG and ARR performed the statistical analysis. LPG and ARR wrote the manuscript draft, and all authors contributed and approved the final article.

References

- [1] K.S. Kendler, L.M. Thornton, C.O. Gardner, Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression, *Am J Psychiatry*. 158 (2001) 582–586. doi:10.1176/appi.ajp.158.4.582.
- [2] E. Haroon, A.W. Daguanno, B.J. Woolwine, D.R. Goldsmith, W.M. Baer, E.C. Wommack, J.C. Felger, A.H. Miller, Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder, *Psychoneuroendocrinology*. 95 (2018) 43–49. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.05.026.
- [3] W.H.O. WHO, Depression and Other Common Mental Disorders - Global Health Estimates, (2017).
- [4] American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®), American Psychiatric Pub, 2013.
- [5] G.R. Heninger, P.L. Delgado, D.S. Charney, The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans, *Pharmacopsychiatry*. 29 (1996) 2–11. doi:10.1055/s-2007-979535.
- [6] D. Lindqvist, F.S. Dhabhar, S.J. James, C.M. Hough, F.A. Jain, F.S. Bersani, V.I. Reus, J.E. Verhoeven, E.S. Epel, L. Mahan, R. Rosser, O.M. Wolkowitz, S.H. Mellon, Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression, *Psychoneuroendocrinology*. 76 (2017) 197–205. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.11.031.

- [7] A.H. Miller, C.L. Raison, The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 22–34. doi:10.1038/nri.2015.5.
- [8] A.J. Eidan, R.A. Al-Harmoosh, H.M. Al-Amarei, Estimation of IL-6, INF γ , and Lipid Profile in Suicidal and Nonsuicidal Adults with Major Depressive Disorder, *J. Interferon Cytokine Res.* 39 (2019) 181–189. doi:10.1089/jir.2018.0134.
- [9] R. Haapakoski, J. Mathieu, K.P. Ebmeier, H. Alenius, M. Kivimäki, Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1 β , tumour necrosis factor α and C-reactive protein in patients with major depressive disorder, *Brain Behav. Immun.* 49 (2015) 206–215. doi:10.1016/j.bbi.2015.06.001.
- [10] L. Capuron, J.F. Gummnick, D.L. Musselman, D.H. Lawson, A. Reemsnyder, C.B. Nemeroff, A.H. Miller, Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions, *Neuropsychopharmacology.* 26 (2002) 643–652. doi:10.1016/S0893-133X(01)00407-9.
- [11] M. Udina, R. Navinés, E. Egmond, G. Oriolo, K. Langohr, D. Gimenez, M. Valdés, E. Gómez-Gil, I. Grande, M. Gratacós, F. Kapczinski, F. Artigas, E. Vieta, R. Solà, R. Martín-Santos, Glucocorticoid Receptors, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Serotonin and Dopamine Neurotransmission are Associated with Interferon-Induced Depression, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19 (2016). doi:10.1093/ijnp/pyv135.
- [12] D.L. Musselman, D.H. Lawson, J.F. Gummnick, A.K. Manatunga, S. Penna, R.S. Goodkin, K. Greiner, C.B. Nemeroff, A.H. Miller, Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 961–966. doi:10.1056/NEJM200103293441303.
- [13] C.L. Raison, M. Demetrashvili, L. Capuron, A.H. Miller, Neuropsychiatric adverse effects of interferon-alpha: recognition and management, *CNS Drugs.* 19 (2005) 105–123. doi:10.2165/00023210-200519020-00002.

- [14] C.L. Raison, A.S. Borisov, B.J. Woolwine, B. Massung, G. Vogt, A.H. Miller, Interferon-alpha effects on diurnal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: relationship with proinflammatory cytokines and behavior, *Mol. Psychiatry*. 15 (2010) 535–547. doi:10.1038/mp.2008.58.
- [15] A. Russell, N. Hepgul, N. Nikkheslat, A. Borsini, Z. Zajkowska, N. Moll, D. Forton, K. Agarwal, T. Chalder, V. Mondelli, M. Hotopf, A. Cleare, G. Murphy, G. Foster, T. Wong, G.A. Schütze, M.J. Schwarz, N. Harrison, P.A. Zunszain, C.M. Pariante, Persistent fatigue induced by interferon-alpha: a novel, inflammation-based, proxy model of chronic fatigue syndrome, *Psychoneuroendocrinology*. 100 (2019) 276–285. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.11.032.
- [16] A. Cattaneo, N. Cattane, V. Begni, C.M. Pariante, M.A. Riva, The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders, *Translational Psychiatry*. 6 (2016) e958. doi:10.1038/tp.2016.214.
- [17] E.S. Wohleb, T. Franklin, M. Iwata, R.S. Duman, Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression, *Nat. Rev. Neurosci*. 17 (2016) 497–511. doi:10.1038/nrn.2016.69.
- [18] N. Rohleder, Stimulation of systemic low-grade inflammation by psychosocial stress, *Psychosom Med*. 76 (2014) 181–189. doi:10.1097/PSY.0000000000000049.
- [19] J.D. Rosenblat, R.S. McIntyre, Bipolar Disorder and Inflammation, *Psychiatr. Clin. North Am*. 39 (2016) 125–137. doi:10.1016/j.psc.2015.09.006.
- [20] M. Papp, Models of affective illness: chronic mild stress in the rat, *Curr Protoc Pharmacol*. Chapter 5 (2012) Unit 5.9. doi:10.1002/0471141755.ph0509s57.
- [21] A.-S.A. Elgarf, S. Aboul-Fotouh, H.A. Abd-Alkhalek, M. El Tabbal, A.N. Hassan, S.K. Kassim, G.A. Hammouda, K.A. Farrag, A.M. Abdel-tawab, Lipopolysaccharide repeated challenge followed by chronic mild stress protocol introduces a combined model of depression in rats: reversibility by imipramine and pentoxifylline, *Pharmacol. Biochem. Behav*. 126 (2014) 152–162. doi:10.1016/j.pbb.2014.09.014.

- [22] L. Cai, R. Li, W. Tang, G. Meng, X. Hu, T. Wu, Antidepressant-like effect of geniposide on chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats by regulating the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, *Eur Neuropsychopharmacol.* 25 (2015) 1332–1341. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.04.009.
- [23] M. Nollet, A.-M. Le Guisquet, C. Belzung, Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice, *Curr Protoc Pharmacol.* Chapter 5 (2013) Unit 5.65. doi:10.1002/0471141755.ph0565s61.
- [24] D.A. Slattery, J.F. Cryan, Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents, *Nat Protoc.* 7 (2012) 1009–1014. doi:10.1038/nprot.2012.044.
- [25] M.D. Kvarta, K.E. Bradbrook, H.M. Dantrassy, A.M. Bailey, S.M. Thompson, Corticosterone mediates the synaptic and behavioral effects of chronic stress at rat hippocampal temporoammonic synapses, *J. Neurophysiol.* 114 (2015) 1713–1724. doi:10.1152/jn.00359.2015.
- [26] M. Papp, P. Gruca, M. Lason-Tyburkiewicz, P. Willner, Antidepressant, anxiolytic and procognitive effects of subacute and chronic ketamine in the chronic mild stress model of depression, *Behav Pharmacol.* 28 (2017) 1–8. doi:10.1097/FBP.0000000000000259.
- [27] Q. Song, C. Fan, P. Wang, Y. Li, M. Yang, S.Y. Yu, Hippocampal CA1 β CaMKII mediates neuroinflammatory responses via COX-2/PGE2 signaling pathways in depression, *J Neuroinflammation.* 15 (2018). doi:10.1186/s12974-018-1377-0.
- [28] Y.M. Ulrich-Lai, H.F. Figueiredo, M.M. Ostrander, D.C. Choi, W.C. Engeland, J.P. Herman, Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291 (2006) E965-973. doi:10.1152/ajpendo.00070.2006.
- [29] P. Willner, A. Towell, D. Sampson, S. Sophokleous, R. Muscat, Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant, *Psychopharmacology (Berl.).* 93 (1987) 358–364.

- [30] A. Gądek-Michalska, J. Spyрка, P. Rachwalska, J. Tadeusz, J. Bugajski, Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity, *Pharmacol Rep.* 65 (2013) 1163–1175.
- [31] J. Keller, R. Gomez, G. Williams, A. Lembke, L. Lazzeroni, G.M. Murphy, A.F. Schatzberg, HPA Axis in Major Depression: Cortisol, Clinical Symptomatology, and Genetic Variation Predict Cognition, *Mol Psychiatry.* 22 (2017) 527–536. doi:10.1038/mp.2016.120.
- [32] Y.-Z. Liu, Y.-X. Wang, C.-L. Jiang, Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases, *Front Hum Neurosci.* 11 (2017). doi:10.3389/fnhum.2017.00316.
- [33] M. Bekhbat, S.A. Rowson, G.N. Neigh, Checks and balances: The glucocorticoid receptor and NFκB in good times and bad, *Front Neuroendocrinol.* 46 (2017) 15–31. doi:10.1016/j.yfrne.2017.05.001.
- [34] G. Kak, M. Raza, B.K. Tiwari, Interferon-gamma (IFN-γ): Exploring its implications in infectious diseases, *Biomol Concepts.* 9 (2018) 64–79. doi:10.1515/bmc-2018-0007.
- [35] A.A.-B. Badawy, Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects, *Int J Tryptophan Res.* 10 (2017) 1178646917691938. doi:10.1177/1178646917691938.
- [36] J.C. O'Connor, C. André, Y. Wang, M.A. Lawson, S.S. Szegedi, J. Lestage, N. Castanon, K.W. Kelley, R. Dantzer, Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin, *J. Neurosci.* 29 (2009) 4200–4209. doi:10.1523/JNEUROSCI.5032-08.2009.
- [37] A.C. Rossetti, M. Papp, P. Gruca, M.S. Paladini, G. Racagni, M.A. Riva, R. Molteni, Stress-induced anhedonia is associated with the activation of the inflammatory system in the rat brain: Restorative effect of pharmacological intervention, *Pharmacol. Res.* 103 (2016) 1–12. doi:10.1016/j.phrs.2015.10.022.
- [38] M.E. Hernandez, L. Martinez-Mota, C. Salinas, R. Marquez-Velasco, N.G. Hernandez-Chan, J. Morales-Montor, M. Pérez-Tapia, M.L. Streber, I. Granados-Camacho, E. Becerril, B.-H. Javier, L.

Pavón, Chronic Stress Induces Structural Alterations in Splenic Lymphoid Tissue That Are Associated with Changes in Corticosterone Levels in Wistar-Kyoto Rats, *Biomed Res Int.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/868742.

[39] B.T. Noble, F.H. Brennan, P.G. Popovich, The spleen as a neuroimmune interface after spinal cord injury, *J. Neuroimmunol.* 321 (2018) 1–11. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.05.007.

[40] M.J. Ramos-Benitez, C. Ruiz-Jimenez, J.J. Rosado-Franco, W.D. Ramos-Pérez, L.B. Mendez, A. Osuna, A.M. Espino, Fh15 Blocks the Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Storm While Modulating Peritoneal Macrophage Migration and CD38 Expression within Spleen Macrophages in a Mouse Model of Septic Shock, *MSphere.* 3 (2018). doi:10.1128/mSphere.00548-18.

[41] M. Saito, T. Ebina, M. Koi, T. Yamaguchi, Y. Kawade, N. Ishida, Induction of interferon-gamma in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of *Streptococcus pyogenes*, *Cell. Immunol.* 68 (1982) 187–192.

[42] F.K. Swirski, M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.-L. Figueiredo, R.H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T.R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, M.J. Pittet, Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites, *Science.* 325 (2009) 612–616. doi:10.1126/science.1175202.

[43] M. Leboyer, I. Soreca, J. Scott, M. Frye, C. Henry, R. Tamouza, D.J. Kupfer, Can bipolar disorder be viewed as a multi-system inflammatory disease?, *J Affect Disord.* 141 (2012) 1–10. doi:10.1016/j.jad.2011.12.049.

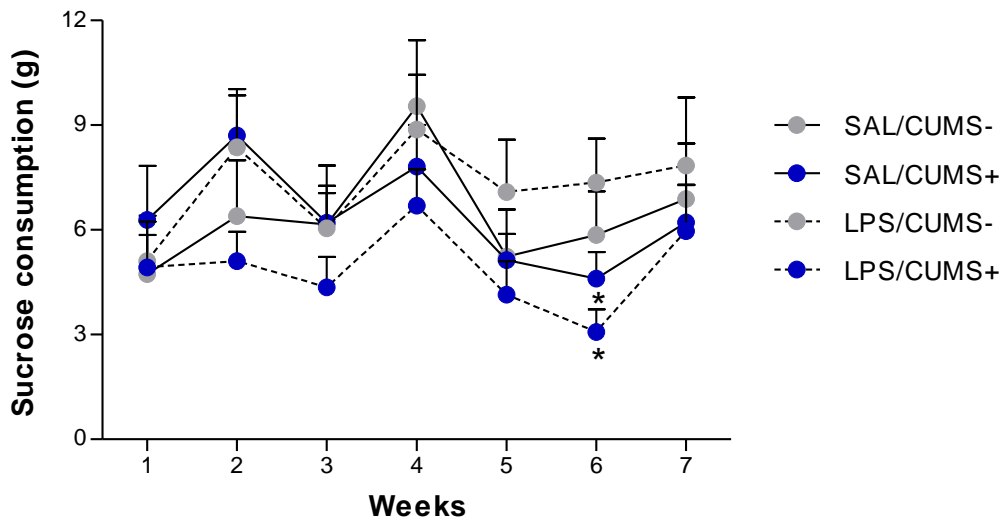
[44] A. Sheldrick, S. Camara, M. Ilieva, P. Riederer, T.M. Michel, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) levels in post-mortem brain tissue from patients with depression compared to healthy individuals - a proof of concept study, *Eur. Psychiatry.* 46 (2017) 65–71. doi:10.1016/j.eurpsy.2017.06.009.

- [45] S. Murakami, H. Imbe, Y. Morikawa, C. Kubo, E. Senba, Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly, *Neurosci. Res.* 53 (2005) 129–139. doi:10.1016/j.neures.2005.06.008.
- [46] S.-S. Shi, S. Shao, B. Yuan, F. Pan, Z.-L. Li, Acute Stress and Chronic Stress Change Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Tyrosine Kinase-Coupled Receptor (TrkB) Expression in Both Young and Aged Rat Hippocampus, *Yonsei Med J.* 51 (2010) 661–671. doi:10.3349/ymj.2010.51.5.661.
- [47] J.B. Ortiz, C.D. Conrad, The impact from the aftermath of chronic stress on hippocampal structure and function: Is there a recovery?, *Frontiers in Neuroendocrinology.* 49 (2018) 114–123. doi:10.1016/j.yfrne.2018.02.005.
- [48] I. Allaman, M. Papp, R. Kraftsik, H. Fiumelli, P.J. Magistretti, J.-L. Martin, Expression of brain-derived neurotrophic factor is not modulated by chronic mild stress in the rat hippocampus and amygdala, *Pharmacol Rep.* 60 (2008) 1001–1007.
- [49] G. Lucca, C.M. Comim, S.S. Valvassori, G.Z. Réus, F. Vuolo, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, E.C. Gavioli, J. Quevedo, Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain, *Neurochem. Int.* 54 (2009) 358–362. doi:10.1016/j.neuint.2009.01.001.
- [50] G.E. Mejia-Carmona, K.L. Gosselink, G. Pérez-Ishiwara, A. Martínez-Martínez, Oxidant/antioxidant effects of chronic exposure to predator odor in prefrontal cortex, amygdala, and hypothalamus, *Mol. Cell. Biochem.* 406 (2015) 121–129. doi:10.1007/s11010-015-2430-2.
- [51] M. Vaváková, Z. Ďuračková, J. Trebatická, Markers of Oxidative Stress and Neuroprogression in Depression Disorder, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* (2015). doi:10.1155/2015/898393.
- [52] M. Herbet, A. Korga, M. Gawrońska-Grzywacz, M. Izdebska, I. Piątkowska-Chmiel, E. Poleszak, A. Wróbel, W. Matysiak, B. Jodłowska-Jędrych, J. Dudka, Chronic Variable Stress Is Responsible for Lipid and DNA Oxidative Disorders and Activation of Oxidative Stress Response

Genes in the Brain of Rats, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. (2017).

doi:10.1155/2017/7313090.

Supplementary material



Supplementary figure. Follow-up on sucrose consumption during LPS-CUMS exposure. Although variations within weeks were observed, a significant reduction on sucrose consumption was observed in the LPS/CUMS- and LPS/CUMS+ groups (*all $p < 0.05$ compared to week 2 and 4, respectively). Repeated measures ANOVA, data expressed by mean \pm SEM.

Supplementary table. Scores of swimming and climbing in the FST after LPS-CUMS exposure.

Group	Swimming	Climbing	n
SAL/CUMS-	24.25 \pm 2.91	6.63 \pm 2.34	8
SAL/CUMS+	19.33 \pm 3.36	0.20 \pm 0.14	15
LPS/CUMS-	18.00 \pm 4.73	3.33 \pm 0.97	9
LPS/CUMS+	20.21 \pm 2.03	0.14 \pm 0.10	14

Two-way ANOVA, data expressed by mean \pm SEM.

4 ARTIGO CIENTÍFICO II

Artigo intitulado “*Claudin-5 expression is not altered in rats injected with amphetamine: lack of preliminary evidence of BBB disruption in an animal model of mania*” em preparação.

Claudin-5 expression is not altered in rats injected with amphetamine: lack of evidence of BBB disruption in an animal model of mania

Géa LP^{1,2}, Bernardo A^{2,3}, Wollenhaupt-Aguiar B², Watts D^{2,3}, Maich W^{2,4}, Mishra RK^{2,3}, Kapczinski F^{2,3,4}, Rosa AR¹, Frey BN^{2,3,4}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite, 500 – Porto Alegre, RS, Brazil.

²Department of Psychiatry and Behavioural Neurosciences, McMaster University, 1280 Main Street West – Hamilton, ON, Canada.

³Neuroscience Graduate Program, McMaster University, 1280 Main Street West – Hamilton, ON, Canada.

⁴St. Joseph's Healthcare Hamilton, 100 West 5th Street – Hamilton, ON, Canada.

Abstract

Bipolar disorder (BD) is a recurrent chronic and disabling mental illness characterized by a low-grade inflammatory state. Patients exhibit high serum levels of proinflammatory cytokines, which is implicated in the development of mood symptoms and cognitive dysfunction. It has been hypothesized that there is an interface mediating the communication between the periphery and the central nervous system (CNS). Considering that, the blood-brain barrier (BBB) disruption has been implicated in the pathophysiology of BD. We aimed to investigate whether the animal model of mania, induced by amphetamine (AMPH), would present with BBB disruption and if it would be reversed by lithium treatment. Male Wistar rats were injected with AMPH (2 mg/kg i.p.) for 14 days and, on the 8th day, lithium treatment (47.5 mg/kg i.p.) was introduced. Hyperactivity was evaluated in the open field test. After euthanasia, blood was collected, and the brain removed. The prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HIP) and striatum (ST) were dissected. Tumor necrosis factor (TNF) α and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were quantified in the serum and brain tissue. Additionally, levels of claudin-5 were also quantified in the brain. AMPH-injected animals exhibited increased overall activity in the open field. In the serum, TBARS levels were increased in the lithium-treated groups, regardless of AMPH injection; while TNF α were not detected. In the brain, TBARS and TNF α did not differ among groups. Also, AMPH and lithium injections did not change claudin-5 protein levels. Although no evidence of BBB disruption was found following AMPH injection, it is essential to investigate this outcome in animal models of BD further.

Keywords

Amphetamine, Lithium, Open field, Blood-brain barrier, Claudin-5, Tumor necrosis factor α , Thiobarbituric acid reactive substances.

1. Introduction

Bipolar disorder (BD) is a recurrent chronic and disabling mental illness associated with high rates of morbidity and mortality, and characterized by acute episodes of depressed, elevated and mixed mood states (Ferrari et al., 2016; Grande et al., 2016). In addition to mood symptoms, patients present with increased peripheral levels of inflammatory cytokines and oxidative stress accompanied with decreased neurotrophic levels (van den Ameele et al., 2018; Rosenblat and McIntyre, 2016; Valvassori et al., 2018). For instance, BD has been described to be associated with a low-grade inflammatory state, which would change simultaneously with mood symptoms and cognitive function during the course of the illness (Rosenblat and McIntyre, 2016). This evidence leads us to consider that there is an interface mediating the communication between the periphery and the central nervous system (CNS), which is the role of the blood-brain barrier (BBB).

The BBB is mainly composed of the endothelial cells of the brain capillaries, astrocyte end-feet and pericytes (Ballabh et al., 2004). The presence of tight and adherens junctions contributes to the tightness of the BBB and its particular function (Banks, 2015). Thus, most blood-borne substances are not allowed to enter the brain under physiological conditions. Although theoretical, the mechanisms underlying the BBB disruption have been suggested to occur due to the increase of inflammatory and oxidative stress parameters. For instance, $TNF\alpha$ and $INF\gamma$ have already been implicated in the downregulation of tight junctions expression, such as claudin-5, one of the essential proteins that maintain the BBB integrity (Capaldo and Nusrat, 2009). Increased levels of reactive oxygen species also have high damage associated potential, which may result from inflammatory processes (Sajja et al., 2016).

The amphetamine (AMPH)-induced animal model has been used to evaluate some aspects of the manic phase of BD (Sharma et al., 2016). It has been shown that AMPH-injected animals display hyperlocomotion, increased serum and brain cytokines – such as IL-6, IL-10, $TNF\alpha$, IL-4 –, and increased oxidative stress – TBARS and protein carbonylation (Benício Noronha Frey et al., 2006; Gubert et al., 2016; Valvassori et al., 2015). Hence, the treatment with lithium prevents and reverses

most of these alterations. Given this evidence and considering that both inflammation and oxidative stress are implicated in BBB increased permeability, we aimed to investigate if such disruption could be observed in the AMPH animal model. Also, we sought to evaluate if lithium would be able to reverse any BBB damage induced by AMPH. To our knowledge, only a few studies have evaluated the BBB disruption in animal models after the injection of psychostimulants, while none has investigated AMPH effects – which would further support its construct and face validity.

2. Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (n=29, 2-month old, weighing 220-310 g) were purchased from Charles Rivers Laboratories (Massachusetts, USA). Animals were housed (n=2 per cage) at standard room temperature and 12-h inverse light/dark cycle, with free access to food and water. This study was approved by the institutional ethics committee from McMaster University (Animal Research Ethics Board project #140828) and all experimental procedures were performed in accordance with national (Guide to the care and use of experimental animals – CCAC, 2017) and international (Guide for the care and use of laboratory animals – NIH, 2011) ethical standards.

2.2. Treatment groups

Initially, animals were allocated in two different groups obtaining similar body weight within groups. From day 1 to 14, animals were injected with d-AMPH (2 mg/kg i.p., diluted in saline solution 0.9%, at 1 mL/kg) or saline (1 mL/kg i.p.) once a day. Then, animals were divided into two other groups. From day 8 to 14, animals were treated lithium chloride (47.5 mg/kg i.p., diluted in saline solution 0.9%, at 1 mL/kg) or saline (1 mL/kg i.p.) twice a day. The doses and duration of protocol were defined as previously described by Frey et al. (2006). Thus, groups of animals were SAL+SAL (n=6), SAL+LI (n=7), AMPH+SAL (n=8) e AMPH+LI (n=8).

2.3. Open field

On day 14, spontaneous locomotor behavior was evaluated 2 h after the last injection of d-AMPH using the open field. The apparatus consisted of a 60x40 cm open field with 50-cm-high walls and divided into 12 equal rectangles. Each animal was placed in the center of the open field and allowed to explore the apparatus for 5 min. All sessions were recorded using a webcam (C270 HD, Logitech), and a video tracking system was used to analyze the number of crossings, distance traveled (m), average speed (m/s) and time in the periphery (s).

2.4. Euthanasia and sample collection

After the behavioral task, rats were anesthetized with isoflurane (4-5% with oxygen at 1-2 L/min). After approximately 5 min, anesthetized animals were decapitated, and the brain was removed as quickly as possible. Right and left prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HIP) and striatum (ST) were dissected and snap frozen in dry ice. Right after decapitation, the troncular blood was also collected and centrifuged (4000 rpm, for 10 min, 4°C). Finally, brain structures and serum were stored -80°C.

2.5. Sample preparation

Right and left brain structures were prepared differently for biochemical assays and western blot. Brain tissue was homogenized using PBS for TNF and TBARS analyses, or RIPA buffer 1x (20-188, Merck Millipore) for western blot at 1:4 (w/v). Both lysis buffers were prepared with EDTA-free protease inhibitor cocktail (11836170001, Roche) according to manufacturer's instructions. Then, samples were centrifuged (10,000g, for 5 min at 5°C) and supernatants were collected and kept at -80°C until further analysis.

2.6. Biochemical analyses

2.6.1. Total protein

Total protein was determined in brain structures using DC Protein Assay Reagent (5000116, BioRad) according to manufacturer`s instructions. Briefly, samples were diluted 1:21 (v/v) in PBS and, after the addition of proper reagents, the total protein content in each sample was quantified in a spectrophotometer at 750 nm.

2.6.2. TNF α

TNF α levels were quantified using a sandwich ELISA kit (KRC3011, InvitrogenTM) according to the manufacturer`s instructions. Serum samples were not diluted, while all brain structures homogenates were diluted at 1:10 (v/v) ratio.

2.6.3. TBARS

TBARS levels were detected and quantified using a colorimetric assay kit (KGE013, R&D Systems) according to the manufacturer`s instructions. Serum samples were diluted at 1:2 (v/v) ratio, PFC and ST homogenates were diluted at 1:20 (v/v) and HIP at 1:20 (v/v) ratios.

2.7. Western blot

Briefly, homogenates samples of PFC, HIP, and ST were further diluted 1:1 (v/v) in 2x Laemmli sample buffer (1610737, BioRad). After that, 20 μ g of each sample was loaded in a 4-20% pre-cast and stain-free mini gels (4568094, BioRad). Electrophoresis was performed at 100 V for 1 h 15 min. The protein transfer was performed using the Trans-Blot[®] TurboTM Transfer System (BioRad) to an LF-PVDF membrane (0.45 μ m pore size, BioRad) at 25 V for 7 min. No specific staining was performed; the total protein and transfer were verified using the ChemiDocTM Imaging Systems (BioRad). Blocking was performed using skim milk powder 5% (diluted in TBS-T) for 1h at room temperature. Primary (Claudin 5 Monoclonal Antibody, 35-2500, Thermo Fisher) and secondary (Peroxidase-AffiniPure Goat

Anti-Mouse IgG (H+L), 115-035-003, JacksonImmunoResearch) antibodies were diluted in TBS-T at 1:500 and 1:10,000, respectively. Clarity Western ECL Substrate (1705060, BioRad) was used for detection. Total protein was used for loading control as described previously (Taylor et al., 2013).

2.7. Statistical analyses

Claudin-5 levels were normalized by the control group (SAL+SAL) levels. The normality of distribution and homogeneity of variance were analyzed. Then, two-way ANOVA was performed considering model (AMPH) and treatment (lithium) as independent factors; followed by Tukey post hoc analysis when applicable. Animals with missing data were excluded from all analyses (n=3). All $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. AMPH induced hyperactivity

AMPH-injected rats presented with overall hyperactivity in the open field indicated by an increased number of crossings, average speed, and distance traveled (Figure 1A-C). Two-way ANOVA indicated a main effect of model for all variables (crossing, $F_{1,25}=9.80$, $p=0.004$; speed, $F_{1,25}=10.47$, $p=0.003$; and distance, $F_{1,25}=11.26$, $p=0.003$), with no main effects for treatment (crossing, $F_{1,25}=0.61$, $p=0.444$; speed, $F_{1,25}=1.86$, $p=0.185$; and distance, $F_{1,25}=2.06$, $p=0.164$) and interaction of factors (crossing, $F_{1,25}=1.29$, $p=0.266$; speed, $F_{1,25}=0.46$, $p=0.502$; and distance, $F_{1,25}=0.38$, $p=0.502$). No differences were observed for time in the periphery (model, $F_{1,25}=0.69$, $p=0.415$; treatment, $F_{1,25}=1.33$, $p=0.260$; and interaction, $F_{1,25}=2.12$, $p=0.158$) (Figure 1D).

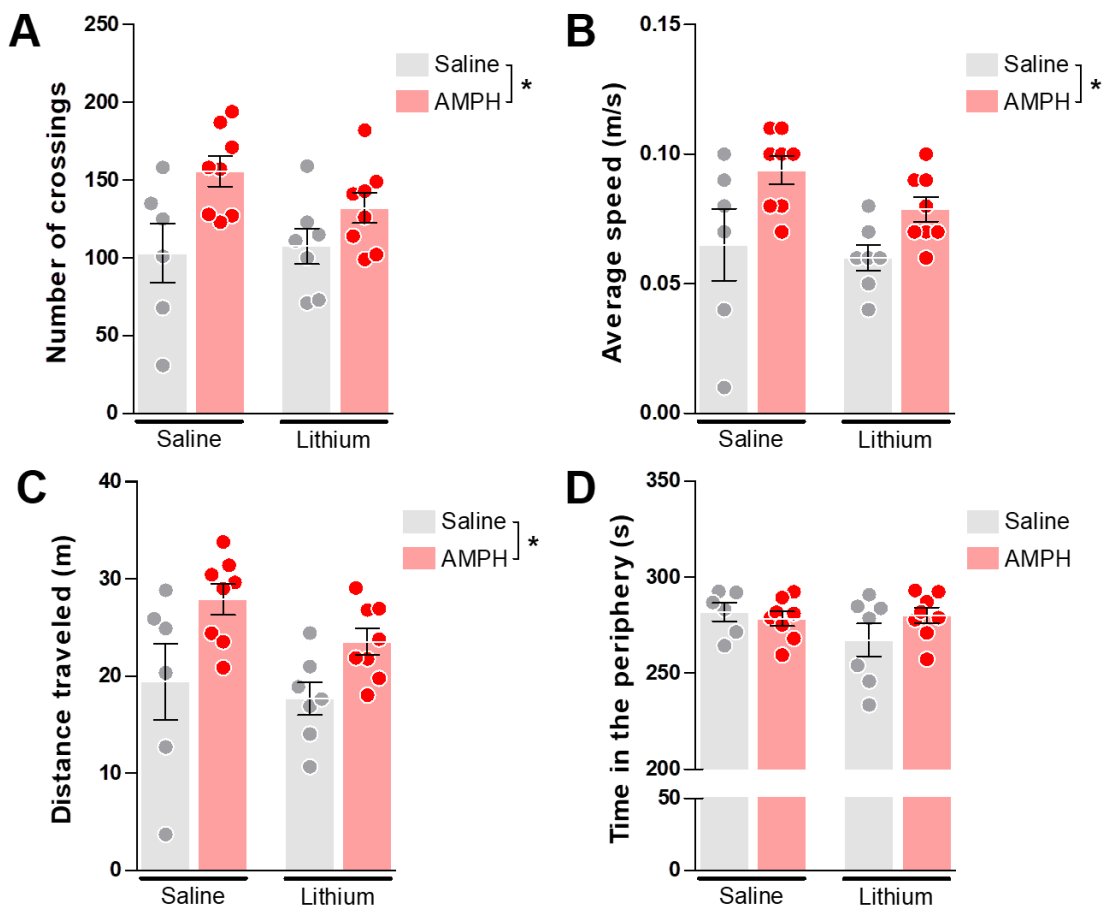


Figure 1. Effects of AMPH and lithium in the locomotor behavior. **A-C.** AMPH increased the frequency of crossing, average speed and distance traveled (*main effect of model, * $p < 0.005$). **D.** Time spent in the periphery was similar among groups. Two-way ANOVA, data expressed by mean \pm SEM.

3.2. AMPH did not increase TNF α and TBARS levels

TNF α levels in the serum were below the limit of detection. In the brain, AMPH did not induced inflammation dependent on TNF α levels and lithium did not exert any changes in these levels. Two-way ANOVA did not indicate main effects of model (PFC, $F_{1,25}=0.50$, $p=0.485$; HIP, $F_{1,24}=0.53$, $p=0.474$; and ST, $F_{1,25}=0.01$, $p=0.995$), treatment (PFC, $F_{1,25}=0.24$, $p=0.632$; HIP, $F_{1,24}=0.03$, $p=0.867$; and ST, $F_{1,25}=0.66$, $p=0.425$) and interaction (PFC, $F_{1,25}=0.16$, $p=0.692$; HIP, $F_{1,24}=1.25$, $p=0.276$; and ST, $F_{1,25}=0.78$, $p=0.386$) (Figure 2A).

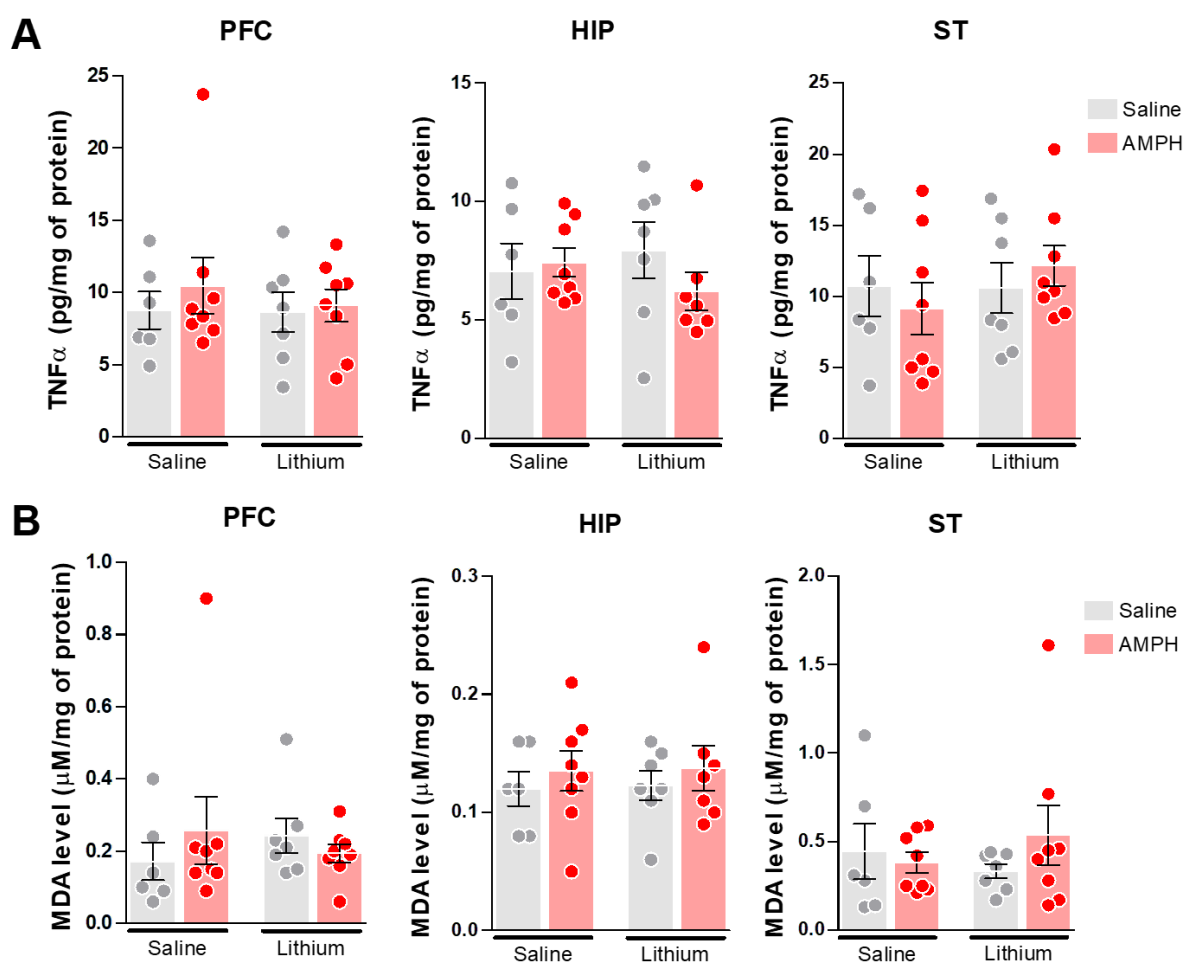


Figure 2. TNF α and TBARS levels in the brain. **A-B.** In the PFC, HIP and ST, AMPH and lithium injections did not change TNF α and TBARS levels. Two-way ANOVA, data expressed by mean \pm SEM.

Unexpectedly, AMPH injection did not increase TBARS levels in both serum (Figure 3) and brain structures (Figure 2B). In the serum, lithium treatment increased lipid peroxidation indicated by treatment effect ($F_{1,25}=8.05$, $p=0.009$), but no main effects for model and interaction of factors were observed ($F_{1,25}=0.29$, $p=0.598$; and $F_{1,25}=0.01$, $p=0.962$, respectively) following two-way ANOVA. In the brain, there were no main effects of model (PFC, $F_{1,25}=0.08$, $p=0.779$; HIP, $F_{1,24}=0.81$, $p=0.379$; and ST, $F_{1,25}=0.34$, $p=0.566$), treatment (PFC, $F_{1,25}=0.01$, $p=0.945$; HIP, $F_{1,24}=0.02$, $p=0.880$; and ST, $F_{1,25}=0.03$, $p=0.859$) and interaction (PFC, $F_{1,25}=1.14$, $p=0.295$; HIP, $F_{1,24}=0.01$, $p=0.983$; and ST, $F_{1,25}=1.21$, $p=0.283$).

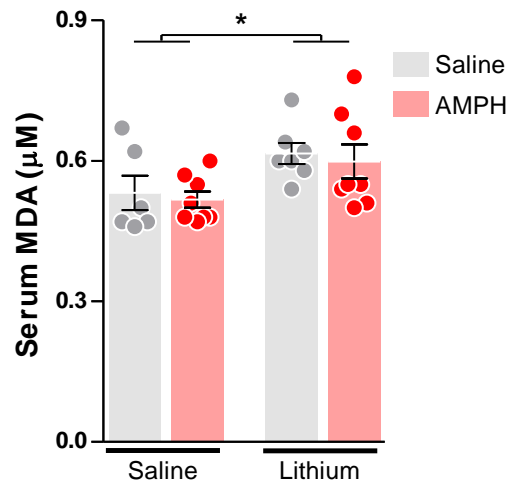


Figure 3. Serum levels of TBARS after AMPH injection and lithium treatment. AMPH did not promote increase of lipid peroxidation, but lithium treatment increased TBARS in the serum of treated rats (main effect of treatment, * $p=0.009$). Two-way ANOVA, data expressed by mean \pm SEM.

3.3. Claudin-5 protein levels in PFC, HIP, and ST were not downregulated following AMPH injections

AMPH did not alter the levels of claudin-5 in the brain. Two-way ANOVA did not indicate main effects for model (PFC, $F_{1,25}=0.16$, $p=0.692$; HIP, $F_{1,24}=1.25$, $p=0.276$; and ST, $F_{1,25}=0.78$, $p=0.386$), treatment (PFC, $F_{1,25}=0.16$, $p=0.692$; HIP, $F_{1,24}=1.25$, $p=0.276$; and ST, $F_{1,25}=0.78$, $p=0.386$) and (PFC, $F_{1,25}=0.16$, $p=0.692$; HIP, $F_{1,24}=1.25$, $p=0.276$; and ST, $F_{1,25}=0.78$, $p=0.386$) after two-way ANOVA analyses (Figure 4).

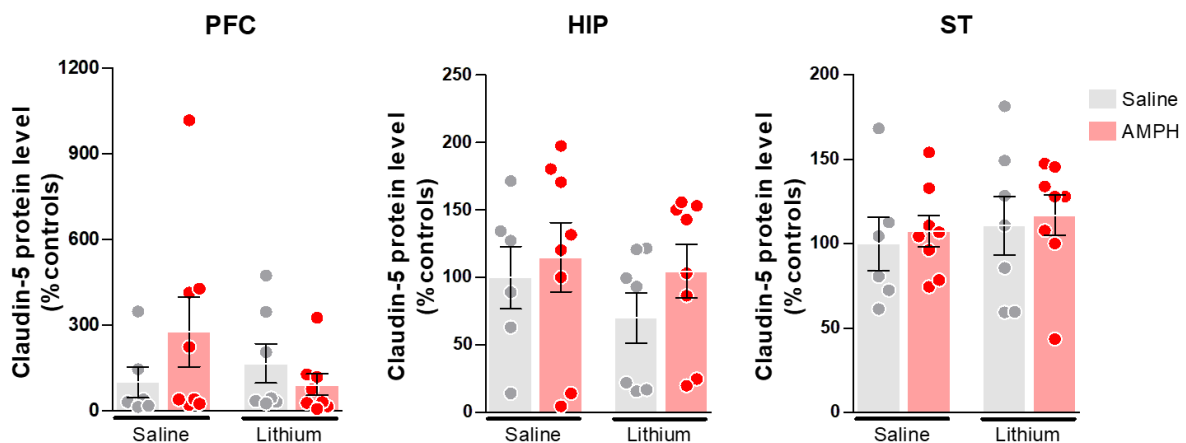


Figure 4. Claudin-5 protein levels in the brain. In the PFC, HIP and ST, claudin-5 protein levels were not statistically different after AMPH and lithium administration. Two-way ANOVA, data expressed by mean \pm SEM.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study that investigated BBB disruption in an animal model of mania induced by AMPH. In accordance with previous findings, we observed a hyperactivity reported by an increase in the number of crossing in the rats injected with AMPH. However, AMPH did not promote a downregulation in the protein levels of tight junctions, more specifically of claudin-5.

AMPH animal model of mania has been used to evaluate alterations in biological parameters that have already been described in individuals with BD. For instance, most clinical and pre-clinical studies have shown an increase in inflammatory and oxidative stress parameters. Using the same protocol, Valvassori et al. (2015) have shown that AMPH exerted a pro-inflammatory effect in rats by increasing of IL-4, IL-6, IL-10, and TNF α in the PFC, ST, and serum, while no alterations were observed in the hippocampus and cerebrospinal fluid (CSF). Interestingly, lithium restored those alterations to control levels. Other psychostimulant drugs, such as methylphenidate and methamphetamine, have also shown to increase inflammatory markers in the HIP of rats (Beirami et al., 2017; Motaghinejad et al., 2017). However, our results showed that rats injected with AMPH did not display an increase of TNF α levels in the brain, while this cytokine was not detected in the serum. Unaltered levels of this same pro-inflammatory cytokine following AMPH injection has been described previously (Gubert et al., 2016). Also, a recent study of our group did not find an increase of serum inflammatory parameters – such as TNF α , IL-1b, and IL-10 – in rats injected with lisdexamphetamine (2 mg/kg i.p., 14 days) (Bristot et al., 2019).

Classically, AMPH is responsible for enhancing the release of dopamine (DA) by inhibiting its reuptake, promoting reverse transport of DA into synaptic cleft independent of stimulus and releasing

DA from synaptic vesicles in the cytoplasm (Calipari and Ferris, 2013). These are the primary mechanisms involved in the AMPH-induced hyperactivity as well as in its neurotoxicity effects. Outside the synaptic vesicles, cytoplasmatic DA is known to have a highly autoxidative capacity which can impair mitochondrial function and increase oxidative stress leading to cell death (Brown and Yamamoto, 2003; Yamamoto and Bankson, 2005). Oxidative stress is an important promoter and a product of the inflammatory response. Unexpectedly, lipid peroxidation, given by TBARS levels, was not augmented following AMPH injection in our animal model. Apparently, TBARS levels were higher in the ST, which is consistent with a higher number of dopaminergic projections in this region, but there were no statistical differences among groups. Findings regarding oxidative stress in the AMPH model vary in the literature. Thus, it seems that more acute protocols or higher doses are more likely to promote such alteration in the CNS (Frey et al., 2006; Gomes et al., 2017; Gubert et al., 2016). In the serum, TBARS levels seemed to be increased in lithium treated animals, but it was not significant. Lithium is known to be nephrotoxic and increased levels of TBARS in the kidney has been described in rats (Davis et al., 2018; Ossani et al., 2019).

Given our hypothesis, inflammation following AMPH administration was thought to occur due to its effects on oxidative stress, and both of these factors are supposed to promote BBB disruption increasing its permeability (Patel and Frey, 2015). The BBB is composed of brain endothelial cells, pericytes and astrocytes (Banks, 2015). The endothelial cells are closely arranged by tight junctions such as claudins. We hypothesized that AMPH would exert a deleterious effect in the BBB by downregulating claudin-5, which would be reverted by lithium treatment. However, claudin-5 levels were not altered in any brain region analyzed. Controversary findings such as increased levels of inflammatory cytokines in the brain parenchyma but no alteration in the CSF indicate that AMPH-injected rats may not present with disrupted BBB (Valvassori et al., 2015). However, other *in vivo* and *in vitro* studies have already reported that methamphetamine and other psychostimulant drugs can disrupt the BBB (Kousik et al., 2012; Northrop and Yamamoto, 2012).

As mentioned before, the mechanisms underlying BBB disruption are not fully elucidated, but it seems to be mediated by inflammation and oxidative stress. For instance, it is believed that the

activation of inflammatory pathways such as NF κ B results in the amplification of the inflammatory signal by promoting the transcription of inflammatory-related genes, which includes matrix metalloproteinases (MMPs) (Hurtado-Alvarado et al., 2016). MMPs are enzymes that degrade the tight junctions which are essential for the maintenance of BBB properties, and methamphetamine has been described to induce MMPs expression (Mizoguchi et al., 2007). Besides, NF κ B pathway activation following TNF α and IL-15 signaling may also be responsible for the downregulation of tight junctions expression, such as claudin-2, in vitro (Stone et al., 2011). Therefore, it could be relevant to consider those pathways when investigating new and current pharmacological therapies for BD and other psychiatric disorders.

Not until recently, BBB disruption has been implicated in the pathophysiology of psychiatric disorders (Patel and Frey, 2015). Increased peripheral levels of inflammatory cytokines and oxidative stress are consistently reported in individuals with BD and are thought to mediate BBB increased permeability as mentioned before (Hurtado-Alvarado et al., 2016). So far, only a few studies have investigated evidence related to BBB disruption in BD. Analyses of biomarkers in the CSF have described higher levels of catecholamine and serotonin metabolites and IL-18 in individuals with BD when compared to healthy subjects (Isgren et al., 2015; Knorr et al., 2018). Increased IL-8 CSF levels were further associated with lithium treatment. Since its discovery, lithium remains as the first-line therapeutic choice for treatment of BD (Yatham et al., 2013). Controversy findings regarding lithium effects in inflammatory parameters have been reported. During euthymia, individuals with BD treated with lithium exhibited increased levels of TNF α and IL-4 when compared to unmedicated patients (Guloksuz et al., 2010), which has also been described in vitro (Liu et al., 2011). On the contrary, lithium treatment reduced inflammatory cytokines and ameliorated increased oxidative stress and inflammatory markers in stimulated monocytes in vitro (Fernandes et al., 2019; Knijff et al., 2007). Also, augmented peripheral TNF α levels were associated with poor response to lithium treatment in individuals with BD (Guloksuz et al., 2012).

Despite its novelty, some limitations should be addressed to our study. Based on previous evidence, we did not explore BBB disruption using biological dyes, such as Evans Blue, which could

be helpful as a first screening. Second, plasmatic levels of lithium were not assessed, but it has been described before that therapeutic levels are reached following this protocol (Frey et al., 2006). Moreover, third, only a few parameters were analyzed, but their important implication on BD as well its possible role in the BBB disruption has been reported. Although an ideal animal model for BD has not been developed, AMPH injection in rodents remains as an established animal model of mania with construct, face and predictive validity (Sharma et al., 2016), while the last one has been questioned (Lan and Einat, 2019). However, it could be possible that this model is not able to mimic the complexity involved in BD pathophysiology, being necessary to identify novel animal models that further allow the evaluation of BBB disruption.

References

van den Aemele S, Fuchs D, Coppens V, de Boer P, Timmers M, Sabbe B, et al. Markers of Inflammation and Monoamine Metabolism Indicate Accelerated Aging in Bipolar Disorder. *Front Psychiatry* 2018;9. doi:10.3389/fpsyt.2018.00250.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004;16:1–13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016.

Banks WA. Peptides and the blood–brain barrier. *Peptides* 2015;72:16–9. doi:10.1016/j.peptides.2015.03.010.

Beirami E, Oryan S, Seyedhosseini Tamijani SM, Ahmadiani A, Dargahi L. Intranasal insulin treatment alleviates methamphetamine induced anxiety-like behavior and neuroinflammation. *Neurosci Lett* 2017;660:122–9. doi:10.1016/j.neulet.2017.09.026.

Bristot G, Ascoli BM, Scotton E, Géa LP, Pfaffenseller B, Kauer-Sant’Anna M. Effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in a lisdexamfetamine animal model of mania. *Braz J Psychiatry* 2019:e1. doi:10.1590/1516-4446-2017-0001.

Brown JM, Yamamoto BK. Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. *Pharmacol Ther* 2003;99:45–53.

Calipari ES, Ferris MJ. Amphetamine Mechanisms and Actions at the Dopamine Terminal Revisited. *J Neurosci* 2013;33:8923–5. doi:10.1523/JNEUROSCI.1033-13.2013.

Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2009;1788:864–71. doi:10.1016/j.bbamem.2008.08.027.

Davis J, Desmond M, Berk M. Lithium and nephrotoxicity: a literature review of approaches to clinical management and risk stratification. *BMC Nephrol* 2018;19:305. doi:10.1186/s12882-018-1101-4.

Fernandes MS, Barbisan F, Azzolin VF, do Prado-Lima PAS, Teixeira CF, da Cruz Jung IE, et al. Lithium is able to minimize olanzapine oxidative-inflammatory induction on macrophage cells. *PLoS ONE* 2019;14:e0209223. doi:10.1371/journal.pone.0209223.

Ferrari AJ, Stockings E, Khoo J-P, Erskine HE, Degenhardt L, Vos T, et al. The prevalence and burden of bipolar disorder: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Bipolar Disorders* 2016;18:440–50. doi:10.1111/bdi.12423.

Frey Benício Noronha, Martins MR, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J, Kapczinski F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. *Bipolar Disorders* 2006;8:275–80. doi:10.1111/j.1399-5618.2006.00318.x.

Frey Benicio N., Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho FC, Bardini K, et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. *J Psychiatry Neurosci* 2006;31:326–32.

Gomes LM, Carvalho-Silva M, Teixeira LJ, Rebelo J, Mota IT, Bilesimo R, et al. Omega-3 fatty acids and mood stabilizers alter behavioral and oxidative stress parameters in animals subjected to fenproporex administration. *Metab Brain Dis* 2017;32:519–28. doi:10.1007/s11011-016-9942-7.

Grande I, Berk M, Birmaher B, Vieta E. Bipolar disorder. *Lancet* 2016;387:1561–72. doi:10.1016/S0140-6736(15)00241-X.

Gubert C, Fries GR, Pfaffenseller B, Ferrari P, Coutinho-Silva R, Morrone FB, et al. Role of P2X7 Receptor in an Animal Model of Mania Induced by D-Amphetamine. *Mol Neurobiol* 2016;53:611–20. doi:10.1007/s12035-014-9031-z.

Guloksuz S, Altinbas K, Aktas Cetin E, Kenis G, Bilgic Gazioglu S, Deniz G, et al. Evidence for an association between tumor necrosis factor-alpha levels and lithium response. *J Affect Disord* 2012;143:148–52. doi:10.1016/j.jad.2012.04.044.

Guloksuz S, Cetin EA, Cetin T, Deniz G, Oral ET, Nutt DJ. Cytokine levels in euthymic bipolar patients. *J Affect Disord* 2010;126:458–62. doi:10.1016/j.jad.2010.04.027.

Hurtado-Alvarado G, Domínguez-Salazar E, Pavon L, Velázquez-Moctezuma J, Gómez-González B. Blood-Brain Barrier Disruption Induced by Chronic Sleep Loss: Low-Grade Inflammation May Be the Link. *J Immunol Res* 2016;2016. doi:10.1155/2016/4576012.

Isgren A, Jakobsson J, Pålsson E, Ekman CJ, Johansson AGM, Sellgren C, et al. Increased cerebrospinal fluid interleukin-8 in bipolar disorder patients associated with lithium and antipsychotic treatment. *Brain Behav Immun* 2015;43:198–204. doi:10.1016/j.bbi.2014.10.001.

Knijff EM, Breunis MN, Kupka RW, Wit HJD, Ruwhof C, Akkerhuis GW, et al. An imbalance in the production of IL-1 β and IL-6 by monocytes of bipolar patients: restoration by lithium treatment. *Bipolar Disorders* 2007;9:743–53. doi:10.1111/j.1399-5618.2007.00444.x.

Knorr U, Simonsen AH, Zetterberg H, Blennow K, Hasselbalch SG, Kessing LV. Biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with bipolar disorder versus healthy individuals: A systematic review. *Eur Neuropsychopharmacol* 2018;28:783–94. doi:10.1016/j.euroneuro.2018.04.002.

Kousik SM, Napier TC, Carvey PM. The Effects of Psychostimulant Drugs on Blood Brain Barrier Function and Neuroinflammation. *Front Pharmacol* 2012;3. doi:10.3389/fphar.2012.00121.

Lan A, Einat H. Questioning the predictive validity of the amphetamine-induced hyperactivity model for screening mood stabilizing drugs. *Behav Brain Res* 2019;362:109–13. doi:10.1016/j.bbr.2019.01.006.

Liu K-J, Lee Y-L, Yang Y-Y, Shih N-Y, Ho C-C, Wu Y-C, et al. Modulation of the development of human monocyte-derived dendritic cells by lithium chloride. *Journal of Cellular Physiology* 2011;226:424–33. doi:10.1002/jcp.22348.

Mizoguchi H, Yamada K, Mouri A, Niwa M, Mizuno T, Noda Y, et al. Role of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of MMP in methamphetamine-induced behavioral sensitization and reward: implications for dopamine receptor down-regulation and dopamine release. *J Neurochem* 2007;102:1548–60. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04623.x.

Motaghinejad M, Motevalian M, Babalouei F, Abdollahi M, Heidari M, Madjd Z. Possible involvement of CREB/BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of topiramate against methylphenidate induced apoptosis, oxidative stress and inflammation in isolated hippocampus of rats: Molecular, biochemical and histological evidences. *Brain Res Bull* 2017;132:82–98. doi:10.1016/j.brainresbull.2017.05.011.

Northrop NA, Yamamoto BK. Persistent neuroinflammatory effects of serial exposure to stress and methamphetamine on the blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012;7:951–68. doi:10.1007/s11481-012-9391-y.

Ossani GP, Uceda AM, Acosta JM, Lago NR, Repetto MG, Martino DJ, et al. Role of Oxidative Stress in Lithium-Induced Nephropathy. *Biol Trace Elem Res* 2019. doi:10.1007/s12011-018-1617-2.

Patel JP, Frey BN. Disruption in the Blood-Brain Barrier: The Missing Link between Brain and Body Inflammation in Bipolar Disorder? *Neural Plast* 2015;2015:708306. doi:10.1155/2015/708306.

Rosenblat JD, McIntyre RS. Bipolar Disorder and Inflammation. *Psychiatr Clin North Am* 2016;39:125–37. doi:10.1016/j.psc.2015.09.006.

Sajja RK, Rahman S, Cucullo L. Drugs of abuse and blood-brain barrier endothelial dysfunction: A focus on the role of oxidative stress. *J Cereb Blood Flow Metab* 2016;36:539–54. doi:10.1177/0271678X15616978.

Sharma AN, Fries GR, Galvez JF, Valvassori SS, Soares JC, Carvalho AF, et al. Modeling mania in preclinical settings: a comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2016;66:22–34. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.11.001.

Stone KP, Kastin AJ, Pan W. NFκB is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. *Cell Physiol Biochem* 2011;28:115–24. doi:10.1159/000331720.

Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Mol Biotechnol* 2013;55:217–26. doi:10.1007/s12033-013-9672-6.

Valvassori SS, Bavaresco DV, Feier G, Cechinel-Recco K, Steckert AV, Varela RB, et al. Increased oxidative stress in the mitochondria isolated from lymphocytes of bipolar disorder patients during depressive episodes. *Psychiatry Res* 2018;264:192–201. doi:10.1016/j.psychres.2018.03.089.

Valvassori SS, Tonin PT, Varela RB, Carvalho AF, Mariot E, Amboni RT, et al. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. *Bipolar Disord* 2015;17:507–17. doi:10.1111/bdi.12299.

Yamamoto BK, Bankson MG. Amphetamine neurotoxicity: cause and consequence of oxidative stress. *Crit Rev Neurobiol* 2005;17:87–117.

Yatham LN, Kennedy SH, Parikh SV, Schaffer A, Beaulieu S, Alda M, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2013. *Bipolar Disord* 2013;15:1–44. doi:10.1111/bdi.12025.

5 ARTIGO CIENTÍFICO III

Artigo original intitulado “*Reduction of hippocampal IL-6 levels in LPS-injected rats following acute exendin-4 treatment*” submetido à *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*.

Reduction of hippocampal IL-6 levels in LPS-injected rats following acute exendin-4 treatment

Luiza P Géa^{1,2}, Eduarda D da Rosa^{1,3}, Bruna S Panizzutti^{1,4}, Érica Z de Aguiar¹, Larissa F de Oliveira¹, Pamela Ferrari¹, Angelo Piato², Rosane Gomez², Rafael Colombo⁵, Adriane R Rosa^{1,2,4,*}

¹Laboratório de Psiquiatria Molecular, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

³Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Programa de Pós-graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Laboratório de Farmacologia e Fisiologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caixas do Sul, RS, Brazil.

*Adriane Ribeiro Rosa, PharmD, PhD

Abstract

Objective: We aimed to investigate the neuroprotective effects of the acute EX-4 treatment in an animal model of inflammation. Therefore, we evaluated three different doses of EX-4 on inflammatory, neurotrophic and oxidative stress parameters in the hippocampus as well as in the serum of lipopolysaccharide(LPS)-injected animals.

Methods: Rats were injected with LPS (0.25 mg/kg i.p.) and treated with different doses of EX-4 (0.1, 0.3, and 0.5 μ g/kg i.p.). Sickness behavior was assessed by locomotor activity and body weight. At the end of the experiment, depressive-like behavior was also evaluated. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and interleukin (IL)-6 were quantified in the serum and hippocampus. Glycemia was also analyzed pre- and post-EX-4 treatment.

Results: LPS groups exhibited a decreased frequency of crossing and reduced body weight, but depressive-like behavior was not observed. The higher dose of EX-4 significantly reduced IL-6 in the hippocampus of LPS-injected animals, and EX-4 *per se* reduced TBARS serum levels with a modest antioxidant effect in the LPS groups.

Conclusion: Our study provides relevant evidence on acute effects of EX-4 treatment which contributes to future studies on repurposing compounds with anti-inflammatory and neuroprotective properties for the management of CNS disorders and associated comorbidities.

Keywords

Inflammation; Interleukin-6; Brain-derived neurotrophic factor; Thiobarbituric acid reactive substances; Glucagon-like peptide 1.

1. Introduction

Over the last years, synthetic analogs of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) have been used as a treatment of type 2 diabetes mellitus¹. Exendin-4 (EX-4, or exenatide) is a natural 39-residue peptide that was first isolated from the salivary secretions of a Gila monster (*Heloderma suspectum*, *Helodermatidae*) and exhibits a longer half-life than the endogenous peptide¹. Interestingly, GLP-1 receptors (GLP-1r) are not exclusive of the islet β cells in the pancreas. In the central nervous system (CNS), GLP-1r are mainly expressed by neurons in most regions of the brain, including hypothalamus and hippocampus^{2,3}. GLP-1r agonists also promote weight loss, and protective effects have also been described in the heart, kidney, and brain in animals and humans⁴, which result in different potential therapeutic effects and enable its use on other pathological conditions besides diabetes.

Increased inflammatory cytokines and oxidative stress levels and reduced neurotrophin levels have been implicated in the pathophysiology of CNS disorders, including psychiatric disorders and neurodegenerative diseases^{5,6}. Inflammation and more specifically interleukin (IL)-6 is directly related to insulin resistance, which may explain why patients with diabetes usually present with depression and have a higher risk to develop Alzheimer's and Parkinson's diseases⁷⁻⁹. Preclinical studies have reported that GLP-1r agonists exert a neuroprotective role by activating pathways involved in cell proliferation, growth, survival, and repair, mainly in animal models of diabetes and neurodegenerative diseases^{10,11}.

Recent evidence showed the activation of neurotrophic pathways and the inhibition of apoptotic signaling in mice that were treated with exenatide for two months¹². Also, GLP-1 has demonstrated an effect on enhancing antioxidant capacity in various tissues by activating cyclic adenosine monophosphate (cAMP), phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC)¹³. Downregulation of TNF- α expression has also been described in intestinal smooth

muscle cells culture¹⁴ and mice¹⁵ that were co-administered with lipopolysaccharide (LPS) and EX-4. Given this evidence, we aimed to investigate whether EX-4, following acute treatment, may exert neuroprotective effects in a rat model of acute inflammation in a dose-dependent manner. Therefore, we evaluated three different doses of EX-4 on inflammatory, neurotrophic and oxidative stress parameters in the hippocampus as well as in the serum of LPS-injected animals.

2. Methods

2.1. Animals

Sixty-nine male Wistar rats (± 300 g and two months old, from *Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório* – CREAL, Porto Alegre, Brazil) were housed 2-3 in a standard cage with free access to water and food and a 12-h light/dark cycle. This study was approved by the institutional animal care and use committee from the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA, project number 15-0002) and all experimental procedures were performed in accordance with national (DBCA n° 30/2016 – CONCEA, 2016) and international (Guide for the care and use of laboratory animals – NIH, 2011) ethical standards.

2.2. Drugs and treatments

Initially, animals were assigned into two experimental groups (saline or LPS) and received either LPS from *Escherichia coli* O111:B4 (0.25 mg/kg diluted in saline; L2630, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA) or saline intraperitoneally (i.p.) (Figure 1). Subsequently, animals were either injected i.p. with saline or EX-4 (0.1, 0.3 or 0.5 μ g/kg diluted in saline; ab120214, Exendin-4/Exenatide, ABCAM, Cambridge, UK). The regimen was previously

described by Porsolt et al. (1978) to evaluate antidepressant effects in rodents by administering the compound of interest 1, 19 and 23 h previous to the forced swim test.

Thus, animals were divided into eight groups: (1) Saline+Saline ($n=8$), (2) Saline+EX-4 0.1 ($n=9$), (3) Saline EX-4 0.3 ($n=6$), (4) Saline+EX-4 0.5 ($n=9$), (5) LPS+Saline ($n=9$), (6) LPS+EX-4 0.1 ($n=10$), (7) LPS+EX-4 0.3 ($n=9$), and (8) LPS+EX-4 0.5 ($n=9$).

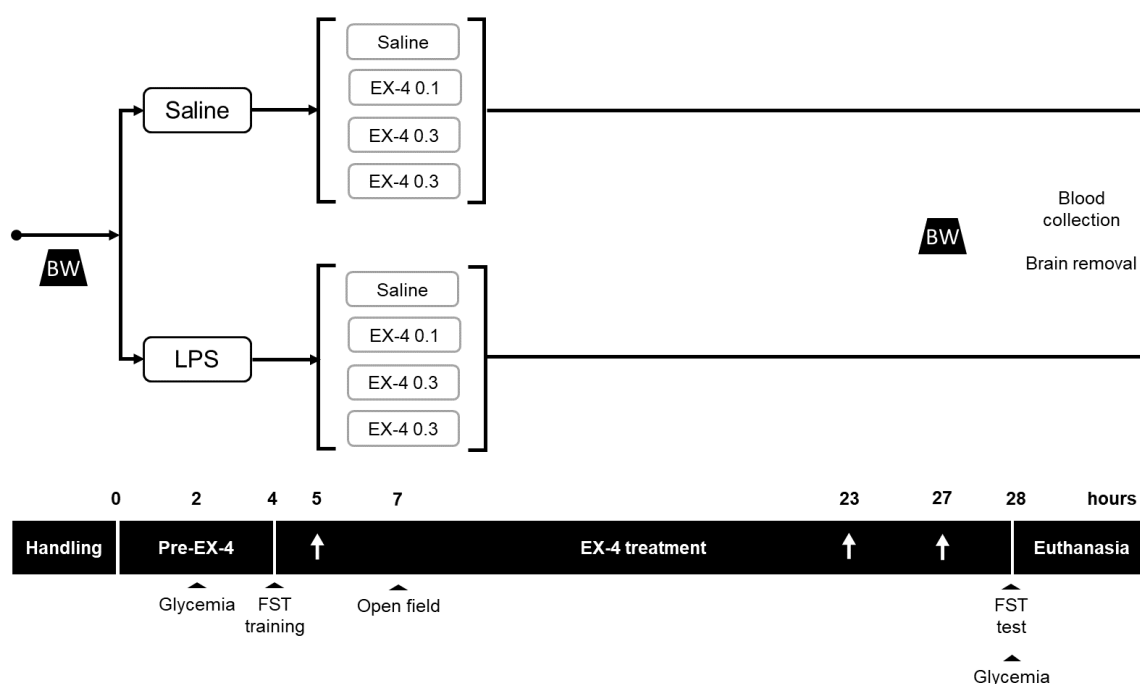


Figure 1. Experimental design. Previous to EX-4 treatment, rats were injected with LPS or saline (i.p.) at 0 h, and glycemia was evaluated. At 4 h, animals were submitted to FST training session and divided into four groups of treatment (saline, and EX-4 0.1 or 0.3 or 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p., white arrows). Sickness behavior was evaluated by variation on body weight, and locomotor activity in the open field (at 7 h). Depressive-like behavior was evaluated in the FST test session (at 28 h), and right after the glycemia was reassessed. Then, animals were euthanized, and biological samples were collected. BW, body weight; EX-4, exendin-4; LPS, lipopolysaccharide; FST, forced swim test.

2.3. Behavioral Assessment

Behavioral tests were recorded with a webcam (C270 HD, Logitech) and analyzed using a video tracking system.

2.3.1. Open Field

Sickness behavior was assessed by spontaneous locomotor activity using the open field. The apparatus consisted of a round arena (78-cm diameter, 36-cm high) with black floor divided into 25 spaces. All animals were placed in the center of the arena and allowed to explore for 5 min.

2.3.2. Forced Swim Test (FST)

Animals were submitted to training (15 min) and test sessions (5 min). Rats were placed individually in a cylinder (25-cm diameter, 50-cm high) filled with water (up to 30 cm, at 23-25°C)^{16,17}. Each animal was dried and returned to their cages after sessions. The analysis consisted of using scores for three different behavior such as swimming, immobility, and climbing during the test session. At every 5-s period, a score was registered to the predominant behavior until the end of the test when each animal totalized 60 scores.

2.4. Glycemia

Non-fasting rats were gently restrained, and a small puncture was made in the lateral tail vein using a sterile needle, and glycemia was accessed using a glucose meter (Accu-Check[®] Performa, Roche Diagnostics). Data were obtained as mg/dL, and the variation of glycemia (difference of pre- and post-EX-4) levels was analyzed.

2.5. Serum and Tissue Samples

All animals were decapitated, and the troncular blood was collected and centrifuged (2057g, 10 min, room temperature). Also, the brain was removed, and the hippocampus was dissected. Both serum and tissue samples were frozen and stored at -80°C until further analysis.

Before the biochemical analysis, the hippocampus was manually homogenized with cold protease inhibitor (80650123, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, USA) diluted in phosphate buffered saline (PBS) at a 1:8 (w/v) ratio. Then, samples were centrifuged (2057g, 10 min, 4°C) and the supernatants were collected and used for the biochemical assays.

2.6. Biochemical Analyses

2.6.1. Total Protein

Hippocampus homogenates were further diluted in PBS at 1:15 (v/v) and the total protein was measured by Bradford's method (5000006, Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA). The standard procedure for microplates was performed using bovine serum albumin (A7906, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA) as the protein standard and according to the manufacturer's protocol.

2.6.2. Interleukin-6 (IL-6)

Serum and hippocampus levels of IL-6 were analyzed by ELISA (Novex KRC0061, Life Technologies Corp., Frederick, USA). All serum and homogenates samples were diluted 1:2 (v/v) and 1:10 (v/v), respectively, in the sample diluent provided in the kit, and processed according to the manufacturer's instructions.

At the end of the experiment, serum levels of IL-6 were detected in only a few saline-injected animals ($n=2$), and almost all LPS-injected rats. Thus, the number of animals was reduced only in the LPS+Sal ($n=7$) and LPS+EX-4 0.5 ($n=6$) groups (n of the other groups remained the same – see section 2.2.).

2.6.3. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

BDNF levels were measured using an ELISA kit (ChemiKine™ CYT306, Millipore, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instructions. Serum and homogenates samples were diluted 1:200 (v/v) and 1:3 (v/v) in sample diluent.

2.6.4. Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

TBARS was measured using a colorimetric assay kit (10009055, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) according to the manufacturer's protocol. Samples were not diluted, and the TBARS levels were given by malondialdehyde formation (μM).

2.7. Statistical Analyses

The normality of the distribution (Shapiro-Wilk test) and the homogeneity of variance (Levene's test) were analyzed. Thus, the inverse normal transformation was used to obtain a Gaussian distribution of TBARS serum levels. The variation (Δ) of body weight was determined by the difference between last and first assessments, and the same was performed for glycemia. Two-way ANOVA – using model (saline and LPS) and treatment (saline, EX-4 0.1, 0.3 and 0.5) as independent factors – was performed; and, when applicable, it was followed by Tukey *post hoc* test. One-way ANOVA was performed to compare IL-6 levels in the serum and hippocampus among LPS groups (see section 2.6.2). Except for IL-6 levels, animals with

any missing data were excluded from all analyses. Overall, data are expressed as mean \pm SEM and all $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

3. Results

3.1. LPS induced sickness behavior which was not improved by any dose of EX-4

A significant body weight reduction was observed in the LPS groups given by lower Δ body weight when compared to saline-injected groups. Two-way ANOVA indicated a main effect of the model, with no main effects of treatment and interaction of factors (Table 1, Figure 2A).

Also, reduced overall activity in the open field was observed in the LPS groups. LPS reduced the number of crossings and average speed (Figure 2B). A main effect of the model was observed following two-way ANOVA for both variables (Table 1).

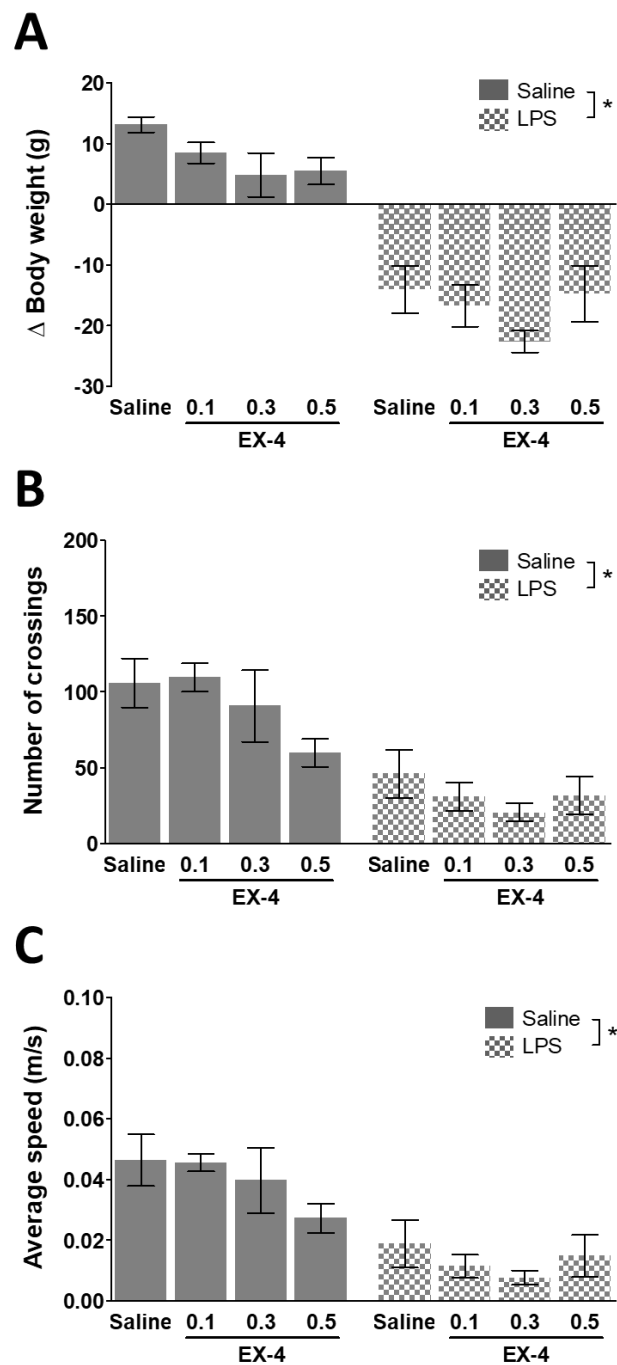


Figure 2. LPS and EX-4 effects on body weight and spontaneous locomotor behavior. **A.** LPS-injected animals presented with reduced body weight at the end of the experiment (main effect of model, $*p < 0.001$). **B-C.** LPS-injected animals exhibited reduced spontaneous locomotor behavior compared to saline groups (main effect of model, $*p < 0.001$). Two-way ANOVA, mean \pm SEM, $n = 6-10$.

The scores of immobility, swimming and climbing were similar across groups (Table S1). Thus, no main effects were observed following two-way ANOVA (Table 1).

Table 1. Results of two-way ANOVA on body weight and behavioral variables.

Dependent variable	Effects	F-value	df	p-value
<i>ΔBody weight</i>	Model	129.88	1,61	<0.001
	Treatment	2.28	3,61	0.089
	Interaction	0.59	3,61	0.627
<i>Crossings</i>	Model	43.16	1,61	<0.001
	Treatment	2.42	3,61	0.075
	Interaction	1.59	3,61	0.202
<i>Speed</i>	Model	37.68	1,61	<0.001
	Treatment	1.43	3,61	0.241
	Interaction	1.35	3,61	0.266
<i>Immobility</i>	Model	0.06	1,61	0.808
	Treatment	1.40	3,61	0.250
	Interaction	1.83	3,61	0.152
<i>Swimming</i>	Model	0.44	1,61	0.510
	Treatment	1.34	3,61	0.271
	Interaction	1.28	3,61	0.289
<i>Climbing</i>	Model	0.59	1,61	0.446
	Treatment	0.40	3,61	0.755
	Interaction	1.97	3,61	0.129

Abbreviations: df, degrees of freedom.

3.2. Inflammation – EX-4 higher dose decreased IL-6 levels in the hippocampus of LPS-injected rats

Following one-way ANOVA, no statistical difference was observed among the LPS groups ($F_{3,31}=1.41$, $p=0.260$, Figure 3A) for IL-6 serum levels. Despite the limitation described, the mean of detected IL-6 serum levels of Saline+Saline group (n=2, dashed line in Fig. 3A)

indicated that LPS was able to induce inflammation, as expected. However, regarding peripheral inflammation, EX-4 treatment did not exhibit an anti-inflammatory effect.

Interestingly, one-way ANOVA revealed a statistical difference in the hippocampal levels of IL-6 among the same LPS groups ($F_{3,31}=3.81$, $p=0.021$, Figure 3B). *Post hoc* analysis indicated that LPS+EX-4 0.5 group exhibited a significant decrease in these levels compared to LPS+Saline ($p=0.018$, Figure 3B), similar to Saline+Saline level (n=2, dashed line in Figure 3B).

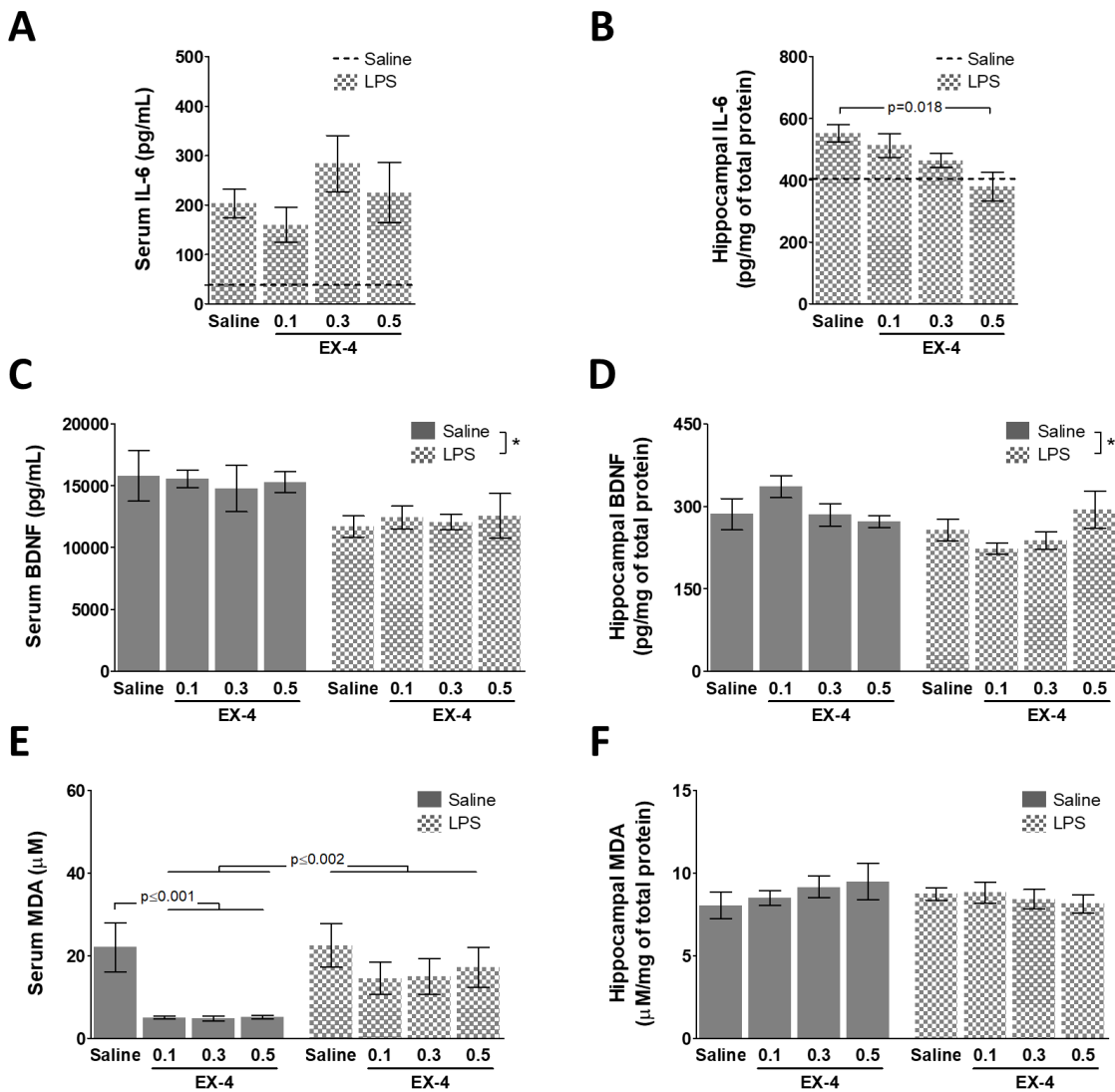


Figure 3. Effect of EX-4 treatment on inflammation, neurotrophins, and oxidative stress. **A.** IL-6 serum levels were mainly detected in LPS-injected animals, and EX-4 treatment did not

reduce peripheral inflammation. **B.** EX-4 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ significantly reduced IL-6 hippocampal levels in LPS-injected animals. The dashed line represents detected levels of IL-6 in Saline+Saline animals ($n=2$). **C.** BDNF serum levels were lower in LPS-injected animals compared to saline groups, independent of treatment with EX-4 (main effect of the model, $*p=0.001$). **D.** BDNF hippocampal levels were slightly reduced in LPS injected-animals (main effect of the model, $*p=0.007$), and EX-4 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ seemed to increase this neurotrophin level (significant interaction of factors, $p=0.016$), but it was not significant following post hoc analyses. **E.** EX-4 was able to reduce TBARS serum levels in treated animals. TBARS statistical analysis is given by the inverse-transformed data, and bars represent non-transformed data. **F.** TBARS hippocampal levels were not different among groups. One- or two-way ANOVA followed by Tukey *post hoc*. All data expressed by mean \pm SEM, $n=6-10$.

3.3. Neurotrophin – EX-4 higher dose tended to restore BDNF levels in the hippocampus

Animals injected with LPS displayed slightly reduced BDNF levels in the serum and hippocampus (Figure 3C and D) as indicated by the main effect for the model following two-way ANOVA (Table 2).

In the hippocampus, LPS+EX-4 0.5 group displayed higher BDNF levels compared to LPS+Saline. Two-way ANOVA also indicated a main effect for the interaction of factors, but not for the treatment (Table 2). Differences were no longer observed following Tukey *post hoc*.

Table 2. Results of two-way ANOVA on biochemical parameters.

Dependent variable	Effects	F-value	df	p-value
<i>Serum BDNF</i>	Model	12.61	1,61	0.001
	Treatment	0.08	3,61	0.971
	Interaction	0.13	3,61	0.941
<i>Hippocampal BDNF</i>	Model	7.66	1,61	0.007
	Treatment	0.40	3,61	0.755
	Interaction	3.72	3,61	0.016
<i>Serum TBARS*</i>	Model	51.63	1,61	<0.001
	Treatment	8.39	3,61	<0.001
	Interaction	3.58	3,61	0.019
<i>Hippocampal TBARS</i>	Model	0.28	1,61	0.600
	Treatment	0.16	3,61	0.924
	Interaction	0.95	3,61	0.423
Δ <i>Glycemia</i>	Model	8.37	1,61	0.005
	Treatment	2.40	3,61	0.077
	Interaction	0.787	3,61	0.506

*Inverse-transformed data. Abbreviations: df, degrees of freedom; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; TBARS, thiobarbituric acid reactive species.

3.4. Oxidative stress – EX-4 *per se* reduced TBARS levels in the serum

EX-4 treatment decreased TBARS levels in the serum. Two-way ANOVA of inverse-transformed data revealed a main effect for both factors and interaction (Table 2). Saline groups treated with EX-4 displayed lower TBARS serum levels compared to Saline+Saline as indicated by *post hoc* analyses (all $p \leq 0.001$). LPS groups treated with EX-4 also presented with reduced TBARS serum levels when compared to LPS+Saline group (non-significant), but these levels were still higher compared to their respective saline groups (all $p < 0.005$, Figure 3E).

On the contrary to what happened in the periphery, TBARS hippocampal levels were similar among groups (Figure 3F, Table 2).

3.5. Glycemia – LPS induced hypoglycemia

Overall, LPS-injected animals exhibited lower Δ glycemia, indicated by lower post-EX-4 glycemic levels compared to pre-EX-4 measurement. EX-4 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ seemed to rescue glycemic levels, but it was not significant (Figure 4). Two-way ANOVA showed a main effect of the model (Table 2).

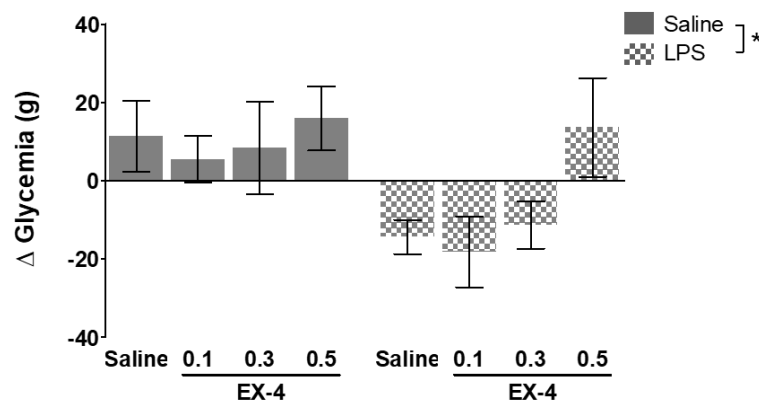


Figure 4. Effects of EX-4 on glycemic levels. LPS decreased glycemia in injected rats regardless of treatment with EX-4 (main effect of the model, $*p=0.004$). Two-way ANOVA, mean \pm SEM, $n=6-10$.

4. Discussion

Currently, there is a growing interest in the potential neuroprotective effects of EX-4 commonly used to treat patients with type 2 diabetes mellitus¹⁸. Thus, our study provides evidence on such a promising anti-inflammatory effect of EX-4 in the CNS, specifically in the hippocampus, after peripheral immune challenge with LPS in vivo. Such evidence provides with new insights into drug repurposing and development.

Sickness behavior following acute LPS was observed by the reduction in body weight and locomotor activity – which is consistent with previous findings^{19,20}. EX-4 tended to decrease exploratory behavior in saline-injected animals, but it was not significant. Anderberg et al. (2016) found that EX-4 (0.3 µg/kg i.p.) reduced overall activity in rats in the open field. Unexpectedly, rats treated with a higher dose of EX-4 (1 µg/kg i.p.) exhibited an anxiety-like behavior; while an antidepressant-like effect was only observed after chronic treatment. Increased time of immobility in the FST and tail suspension test in mice has been reported at 24 and 28 h following acute administration of LPS^{20,22}, but evidence also suggests otherwise¹⁹. Thus, we suppose that the effect of LPS could be attenuated after 28 h – when depressive-like behavior was not observed – and that a chronic EX-4 treatment would be expected to exert an antidepressant-like effect^{23,24}.

Until now, few studies have described the neuroprotective effects of EX-4, and have actually observed anti-inflammatory effects in the CNS²⁵. In our study, the higher dose of EX-4 reduced IL-6 hippocampal levels in LPS-injected rats. A similar study has shown that pre-treatment with EX-4 (0.5 µg/kg, daily, 5 days) reduced the time of immobility in the FST in LPS-injected rats, but it did not decrease IL-1 β and TNF- α in the CNS²⁴. Unexpectedly, we did not observe an anti-inflammatory effect of EX-4 in the periphery. Interestingly, under pathological conditions, such as asthma, GLP-1r expression in peripheral leucocytes is lower, but in vitro treatment of these cells with a GLP-1 analog, followed by LPS, attenuated the secretion of most cytokines, but not all²⁶. Still, higher levels of inflammation in the periphery is known to activate immune cells which is accompanied by an increase in oxidative stress²⁷. The inflammatory cytokines in the periphery can reach the brain triggering a central inflammatory response¹⁹. Considering that hippocampus plays an essential role in synaptic plasticity, the protection of its milieu against injuries – such as inflammation – is required to avoid impaired neurogenesis and learning²⁸.

LPS did not increase oxidative stress in both serum and hippocampus, but EX-4 *per se* decreased TBARS serum levels, with a more modest antioxidant effect in the LPS groups. It has been described that the antioxidant effects of GLP-1r agonists may be mediated by the reduction of oxidative stress markers, and the increase of antioxidant enzymes activity^{29,30}. Therefore, we believed that EX-4 was able to reduce TBARS serum levels by decreasing the expression of NADPH oxidase and increasing the expression of superoxide dismutase, as previously described in monocytes *in vitro*³¹. Therefore, a significant reduction of oxidative stress in the periphery after acute EX-4 treatment could contribute to reducing central inflammation.

GLP-1r activation is also known to trigger cAMP and PI3k pathways¹³ – which lead to the activation of mitogen-associated protein kinase (MAPK) and AKT pathways, resulting in the inhibition of pro-inflammatory cascades and NFκB, respectively³². Thus, EX-4 is expected to inhibit apoptosis, reduce oxidative stress and promote neurogenesis^{32,33}. Decreased levels of BDNF following LPS challenge is consistent with the literature³⁴. Besides that, we found that LPS-injected animals treated with EX-4 0.5 µg/kg exhibited an apparent higher concentration of BDNF in the hippocampus, but it was not significant following *post hoc* analysis. Currently, most studies that observed an increase of neurotrophic levels after treatment with GLP-1r agonists were performed in animal models of diabetes type 2 and neurodegenerative disorders^{35,36}. Recently, a clinical trial found that patients with Parkinson's disease on dopaminergic therapy who were treated with exenatide exhibited improved motor scores and augmented levels of downstream proteins AKT and mTOR – pathways related to the neuroprotective role of EX-4³⁷.

Interestingly, we observed different outcomes in the serum and hippocampus. EX-4 is known to readily cross the BBB³⁸. After 10 min of peripheral injection, serum availability is

100%, and the percentage that reaches the CNS is 82.8%, potentially achieving 90%³⁸. Although EX-4 is usually administered peripherally, it is believed that its effects also occur centrally. Once it crosses the BBB and is transported through vagal afferents, EX-4 treatment promotes satiety and reduction of food intake, mainly controlled by the brain³⁹. Such effect can be observed within an hour following peripheral administration³⁹. These findings demonstrate its effectiveness and affinity to the CNS.

In patients with type 2 diabetes, EX-4 is used to manage glycemic levels, usually reducing fasting plasma glucose¹. In accordance with other findings, LPS groups exhibited lower glycemic levels⁴⁰, which were not improved by any dose of EX-4. We evaluated glycemia in non-fasting animals, which is a limitation of the acute experimental design and could explain why we did not observe any response following EX-4 treatment. Also, other limitations should be addressed in our study. First, different doses and regimen of LPS and EX-4 are reported in the literature. The dose of LPS used in our study is relatively low, which can explain why LPS-injected animals did not exhibit significantly depressive-like behavior and higher levels of TBARS. Second, the detection of inflammatory cytokines in rats is challenging due to the lack of high sensitivity kits, which has already been reported by other studies^{24,30}. Third, only a few biochemical parameters were analyzed, but all of them are relevant and known to be implicated in the pathophysiology of most CNS disorders and may be modulated by EX-4.

Although there is no consensus regarding the neuroprotective dose of EX-4, we found compelling evidence on central anti-inflammatory effects of acute treatment with EX-4 0.5 µg/kg in the hippocampus of LPS-injected rats. Thus, a chronic EX-4 regimen using this dose should promote substantial therapeutic effects in animal models. EX-4 therapeutic potential seems to be mediated by its pleiotropic effects, being most of them synergic in promoting cell survival and enabling damage repair. Thus, repurposing compounds with potential anti-inflammatory and neuroprotective properties – such as GLP-1r agonists – is of great value for

the management of CNS disorders and associated comorbidities, and supports the development of new therapies.

Acknowledgments

LPG is a scholarship recipient from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). RG receives a Research Productivity Scholarship (PQ2) from CNPq. This work was supported by the Research Incentive Fund of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* [grant number 15-0002, ARR] and the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq [grant numbers 401162/2016-8 and 302800/2017-4, AP].

References

1. Andersen A, Lund A, Knop FK, Vilsbøll T. Glucagon-like peptide 1 in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Jul;14(7):390–403.
2. Alvarez E, Martínez MD, Roncero I, Chowen JA, García-Cuartero B, Gispert JD, et al. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem*. 2005 Feb;92(4):798–806.
3. Cork SC, Richards JE, Holt MK, Gribble FM, Reimann F, Trapp S. Distribution and characterisation of Glucagon-like peptide-1 receptor expressing cells in the mouse brain. *Mol Metab*. 2015 Aug 5;4(10):718–31.
4. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20 Suppl 1:5–21.

5. Elfawy HA, Das B. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2019 Feb 1;218:165–84.
6. Ruiz NAL, del Ángel DS, Olguín HJ, Silva ML. Neuroprogression: the hidden mechanism of depression. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018 Oct 30;14:2837–45.
7. Akter K, Lanza EA, Martin SA, Myronyuk N, Rua M, Raffa RB. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Mar;71(3):365–76.
8. Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017;27(3):229–36.
9. Semenkovich K, Brown ME, Svrakic DM, Lustman PJ. Depression in type 2 diabetes mellitus: prevalence, impact, and treatment. *Drugs.* 2015 Apr;75(6):577–87.
10. Gault VA, Hölscher C. GLP-1 receptor agonists show neuroprotective effects in animal models of diabetes. *Peptides.* 2018 Feb 1;100:101–7.
11. He J, Zhang X, Lian C, Wu J, Fang Y, Ye X. Exendin-4 prevented pancreatic beta cells from apoptosis in (Type I) diabetic mouse via keap1-Nrf2 signaling. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019 Jan 1;244(1):28–35.
12. Bomba M, Granzotto A, Castelli V, Massetti N, Silvestri E, Canzoniero LMT, et al. Exenatide exerts cognitive effects by modulating the BDNF-TrkB neurotrophic axis in adult mice. *Neurobiol Aging.* 2018;64:33–43.

13. Oh YS, Jun H-S. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 22;19(1).
14. Al-Dwairi A, Alqudah TE, Al-Shboul O, Alqudah M, Mustafa AG, Alfaqih MA. Glucagon-like peptide-1 exerts anti-inflammatory effects on mouse colon smooth muscle cells through the cyclic adenosine monophosphate/nuclear factor- κ B pathway in vitro. *J Inflamm Res.* 2018;11:95–109.
15. Shen W-R, Kimura K, Ishida M, Sugisawa H, Kishikawa A, Shima K, et al. The Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Exendin-4 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Osteoclast Formation and Bone Resorption via Inhibition of TNF- α Expression in Macrophages. *J Immunol Res.* 2018;2018:5783639.
16. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978 Feb 15;47(4):379–91.
17. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.* 2012 May 3;7(6):1009–14.
18. Sfairopoulos D, Liatis S, Tigas S, Liberopoulos E. Clinical pharmacology of glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Hormones (Athens).* 2018 Sep;17(3):333–50.
19. Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:271359.
20. O'Connor JC, Lawson MA, André C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry.* 2009 May;14(5):511–22.

21. Anderberg RH, Richard JE, Hansson C, Nissbrandt H, Bergquist F, Skibicka KP. GLP-1 is both anxiogenic and antidepressant; divergent effects of acute and chronic GLP-1 on emotionality. *Psychoneuroendocrinology*. 2016 Mar;65:54–66.
22. Li R, Zhao D, Qu R, Fu Q, Ma S. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neurosci Lett*. 2015 May 6;594:17–22.
23. Isacson R, Nielsen E, Dannaeus K, Bertilsson G, Patrone C, Zachrisson O, et al. The glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 improves reference memory performance and decreases immobility in the forced swim test. *Eur J Pharmacol*. 2011 Jan 10;650(1):249–55.
24. Ventorp F, Bay-Richter C, Nagendra AS, Janelidze S, Matsson VS, Lipton J, et al. Exendin-4 Treatment Improves LPS-Induced Depressive-Like Behavior Without Affecting Pro-Inflammatory Cytokines. *J Parkinsons Dis*. 2017;7(2):263–73.
25. Harkavyi A, Whitton PS. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation as a means of neuroprotection. *Br J Pharmacol*. 2010 Feb;159(3):495–501.
26. Mitchell PD, Salter BM, Oliveria JP, El-Gammal A, Tworek D, Smith SG, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor expression on human eosinophils and its regulation of eosinophil activation. *Clin Exp Allergy*. 2017 Mar;47(3):331–8.
27. Muriach M, Flores-Bellver M, Romero FJ, Barcia JM. Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy [Internet]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014 [cited 2019 Mar 8]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/102158/>

28. Guo L-L, Wang D-S, Xu Y-Y, Cui K-G. Effects of IL-1 β on hippocampus cell apoptosis and learning ability of vascular dementia rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Sep;22(18):6042–8.
29. Petersen KE, Rakipovski G, Raun K, Lykkesfeldt J. Does Glucagon-like Peptide-1 Ameliorate Oxidative Stress in Diabetes? Evidence Based on Experimental and Clinical Studies. *Curr Diabetes Rev*. 2016 Dec;12(4):331–58.
30. Kim S, Jeong J, Jung H-S, Kim B, Kim Y-E, Lim D-S, et al. Anti-inflammatory Effect of Glucagon Like Peptide-1 Receptor Agonist, Exendin-4, through Modulation of IB1/JIP1 Expression and JNK Signaling in Stroke. *Exp Neurobiol*. 2017 Aug;26(4):227–39.
31. Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, Machnik G, Bołdys A, Okopień B. Exenatide (a GLP-1 agonist) improves the antioxidative potential of in vitro cultured human monocytes/macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2015;388(9):905–19.
32. Athauda D, Foltynie T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. *Drug Discovery Today*. 2016 May 1;21(5):802–18.
33. Li H, Lee CH, Yoo K-Y, Choi JH, Park OK, Yan BC, et al. Chronic treatment of exendin-4 affects cell proliferation and neuroblast differentiation in the adult mouse hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience Letters*. 2010 Dec 3;486(1):38–42.
34. Hritcu L, Gorgan LD. Intranigral lipopolysaccharide induced anxiety and depression by altered BDNF mRNA expression in rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Jun 3;51:126–32.

35. Ji C, Xue G-F, Lijun C, Feng P, Li D, Li L, et al. A novel dual GLP-1 and GIP receptor agonist is neuroprotective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease by increasing expression of BDNF. *Brain Res.* 2016 Mar 1;1634:1–11.
36. Abdelwahed OM, Tork OM, Gamal el Din MM, Rashed L, Zickri M. Effect of glucagon-like peptide-1 analogue; Exendin-4, on cognitive functions in type 2 diabetes mellitus; possible modulation of brain derived neurotrophic factor and brain Visfatin. *Brain Research Bulletin.* 2018 May 1;139:67–80.
37. Athauda D, Gulyani S, Karnati H, Li Y, Tweedie D, Mustapic M, et al. Utility of Neuronal-Derived Exosomes to Examine Molecular Mechanisms That Affect Motor Function in Patients With Parkinson Disease: A Secondary Analysis of the Exenatide-PD Trial. *JAMA Neurol.* 2019 Jan 14;
38. Kastin AJ, Akerstrom V. Entry of exendin-4 into brain is rapid but may be limited at high doses. *International Journal of Obesity.* 2003 Mar;27(3):313–8.
39. Baraboi E-D, St-Pierre DH, Shooner J, Timofeeva E, Richard D. Brain activation following peripheral administration of the GLP-1 receptor agonist exendin-4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011 Oct;301(4):R1011-1024.
40. Nguyen AT, Mandard S, Dray C, Deckert V, Valet P, Besnard P, et al. Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway. *Diabetes.* 2014 Feb;63(2):471–82.

Supplementary Table. Scores of immobility, swimming, and climbing in the test session of the FST.

Groups	Scores FST		
	Immobility	Swimming	Climbing
<i>Saline+Saline</i>	29.63±11.44	22.63±11.25	7.75±7.23
<i>Saline+EX-4 0.1</i>	40.56±8.29	13.44±7.75	6.00±3.12
<i>Saline+EX-4 0.3</i>	37.50±8.60	17.17±5.60	5.33±7.37
<i>Saline+EX-4 0.5</i>	40.11±14.13	16.22±11.94	3.67±3.71
<i>LPS+Saline</i>	34.67±7.65	21.67±8.26	3.67±4.90
<i>LPS+EX-4 0.1</i>	33.20±16.64	21.70±14.00	5.10±4.65
<i>LPS+EX-4 0.3</i>	45.44±13.41	12.00±10.42	2.56±5.15
<i>LPS+EX-4 0.5</i>	31.44±16.34	21.00±12.09	7.56±5.22

Data expressed by mean ± SEM, two-way ANOVA, all $p > 0.05$, $n = 6-10$.

6 DISCUSSÃO

De uma forma geral, este trabalho procurou elucidar a relação periférico-central das alterações de parâmetros inflamatórios, neurotróficos e oxidativos e investigar a alteração da permeabilidade da BHE nos transtornos de humor utilizando diferentes modelos animais. Ainda, considerando a importância já discutida da inflamação na fisiopatologia dos transtornos de humor, este trabalho também se propôs a avaliar os efeitos neuroprotetores da EX-4, um agonista de GLP-1r, e, portanto, a sua utilização como fármaco adjuvante no tratamento dos transtornos de humor.

Os resultados referentes ao modelo crônico de estresse crônico (Artigo científico I) corroboram a reprodutibilidade deste modelo, bem como a relevância em utilizar estímulos estressores variados e imprevisíveis no desenvolvimento do comportamento tipo-depressivo em roedores. Apenas a exposição ao estresse resultou em significativa redução do ganho de peso corporal, aumento dos escores de *coat state*, hiperatividade e hipertrofia da glândula adrenal. Quanto aos marcadores periféricos, observamos um aumento das concentrações de IFN γ e redução de BDNF, sem alteração de TBARS. Enquanto que, no hipocampo, as concentrações de BDNF e TBARS não foram diferentes entre os grupos. Além disso, a combinação dos estressores com a administração prévia de LPS resultou em um comportamento tipo-anedônico mais exacerbado nestes animais, representado pelo menor consumo de sacarose ao final do experimento. Esta redução significativa no grupo do protocolo combinado é relevante uma vez que favorece a comparação com grupos controles em desfechos que apenas o estresse não seja capaz de alterar, ou ainda quando os animais apresentam uma alta variabilidade individual intragrupo. Ainda, uma correlação moderada negativa e significativa da concentração sérica de IFN γ com o comportamento tipo-anedônico dado pelo consumo de sacarose foi observada apenas nos animais submetidos ao protocolo combinado. Primeiramente, estes resultados enfatizam a influência da inflamação (evidenciado pelos níveis elevados de IFN γ) na fisiopatologia da depressão ao mesmo tempo que possibilitam o estudo de novos alvos terapêuticos como terapia coadjuvante para os transtornos de humor. Além disso, os mesmos reforçam a validade de constructo do protocolo LPS-CUMS, uma vez que o mesmo foi capaz de reproduzir os componentes fisiopatológicos da depressão ao incluir um componente inflamatório ao protocolo de estresse crônico.

Estudos recentes utilizam abordagens diferentes deste mesmo protocolo combinado. Após a administração de LPS (3 mg/kg i.p.) seguida de estresse crônico, Mao e cols. (2019)

observaram uma redução do peso corporal associado à hipertrofia da glândula adrenal e aumento da corticosterona plasmática, além dos comportamentos tipo-ansioso, tipo-depressivo e prejuízo cognitivo. A maioria destas alterações foram revertidas pelo tratamento crônico com fluoxetina. Xia e cols. (2018) sugerem que a administração de LPS em diferentes momentos antes, durante e depois de um protocolo de estresse crônico (35 dias) também pode produzir efeitos diferentes no comportamento (XIA et al., 2018). Os autores observaram que, somente quando o LPS (0,1 mg/kg i.p.) era administrado na metade do tempo do protocolo de estresse, os animais apresentavam comportamento tipo-depressivo e que apenas o estresse crônico já seria suficiente para promover neuroinflamação. Outros pesquisadores reportaram que a administração concomitante de LPS (0,25 mg/kg i.p.) associada ou não ao estresse crônico durante 7 dias foi capaz de promover um aumento de IL-1 β hipocampal e da expressão de TLR4 e NF κ B, sendo os desfechos mais exacerbados no grupo do protocolo combinado (YAN et al., 2017). Camundongos submetidos a administração de LPS (0,1 mg/kg i.p.) após 10 dias de estresse também apresentaram comportamento tipo-depressivo, sem alterações robustas na expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF α (COUCH et al., 2016). Estes achados, convergentes aos nossos, indicam o quanto o protocolo proposto é promissor, podendo auxiliar na indução da suscetibilidade e de comportamento tipo-depressivo mais expressivo nos animais submetidos ao estresse crônico.

Além da inflamação, a redução da expressão de BDNF periférico e central é o achado mais comum em modelos animais de transtornos de humor, considerando que esta neurotrofina é sabidamente um alvo do tratamento com antidepressivos. Como mencionado, observamos que apenas a exposição ao estresse crônico resultou na redução de níveis periféricos de BDNF, sem alteração em nível central. Uma revisão sistemática dos achados envolvidos com a neurobiologia em modelos de estresse crônico reporta que este desfecho pode ser variável (ALLAMAN et al., 2008; HILL et al., 2012; LARSEN et al., 2010). A redução da expressão de BDNF é consistente no giro denteado e região CA3 do hipocampo e, em contraste, os neurônios na amígdala apresentam aumento da densidade de espinhos dendríticos e, conseqüentemente, de BDNF. Fatores que contribuem para essa diferença entre os achados de BDNF no encéfalo de animais submetidos a estresse crônico incluem a idade em que os animais foram submetidos ao estresse, da região cerebral analisada e da duração e tipo de protocolo utilizado (ZALETEL; FILIPOVIĆ; PUŠKAŠ, 2017). Porém, a explicação mais plausível para os nossos achados é de que, após o término, normalmente de 2 a 3 semanas, é comum observar uma reorganização neural, com aumento de plasticidade sináptica para ganho de função, fenômeno que pode ser

observado em humanos e roedores normalmente (ORTIZ; CONRAD, 2018). Este efeito atribuído ao BDNF pode ser consequência da sua capacidade de regular diretamente a expressão de CRH e vice-versa. Além disso, o estresse crônico é capaz de aumentar a expressão de uma fosfatase (*i.e.*, MKP-1) que inibe a via MAPK no SNC – via ativada pelo BDNF – e consequentemente crescimento axonal (DASKALAKIS et al., 2015). Quando a exposição ao estresse cessa, os níveis de glicocorticoides normalizam bem como a expressão de BDNF (JEANNETEAU et al., 2010). Ainda, a enzima ativadora tecidual do plasminogênio (tpA) responsável pela conversão de proBDNF na neurotrofina madura é sabidamente regulada pelo CRF (MATYS et al., 2004). Na presença de estímulos estressores, o aumento de CRH facilita a liberação de tpA durante a despolarização na amígdala, motivo pelo qual é comum observar aumento de BDNF nesta região após o estresse (BENNETT; LAGOPOULOS, 2014). Porém, esta enzima também é expressa no hipocampo e a redução da expressão da mesma no soro já foi observada em indivíduos com TDM (JIANG et al., 2017). Estas evidências indicam uma regulação muito complexa da plasticidade sináptica nesta região, a qual é importante para a preservação da cognição e resposta terapêutica antidepressiva, principalmente nos transtornos de humor, e que deve ser interpretada com cautela nos modelos animais.

Por sua vez, a administração de AMPH em roedores permite reproduzir a mania, principal característica do TB. Porém, a falta da manifestação da ciclagem espontânea de episódios resulta em um modelo animal de TB limitado. No Artigo científico II, a AMPH foi capaz de induzir a hiperatividade, comportamento já validado em estudos prévios (FREY et al., 2006d; VALVASSORI et al., 2015). Nosso estudo, no entanto, foi pioneiro em investigar o papel da AMPH em induzir dano à BHE, e ao mesmo tempo da possível reversão deste mecanismo pelo tratamento com lítio. Entretanto, os animais submetidos a injeções de AMPH não apresentaram aumento das concentrações séricas e centrais de TNF α e TBARS. Assim, considerando que os níveis destes marcadores mantiveram-se inalterados, a expressão da proteína claudina-5 – uma das *tight junctions* responsáveis pela manutenção da integridade da BHE – também não sofreu alteração após administração de AMPH. Evidências na literatura indicam que drogas psicoestimulantes são capazes de promover a redução da expressão das *tight junctions*, o que gera um aumento da permeabilidade da BHE permitindo um menor controle da comunicação dos compartimentos periférico e central (O'SHEA et al., 2014). Pelo fato de ser um dos primeiros estudos que se propôs a avaliar alterações de permeabilidade da BHE em um modelo de mania utilizando AMPH, pode-se sugerir que este pode não ser o melhor modelo para avaliar o papel desta alteração nos transtornos de humor.

Apesar dos estudos apresentados na Tabela 4 indicarem uma reprodutibilidade dos componentes fisiopatológicos discutidos neste trabalho – inflamação, neurotrofinas e estresse oxidativo –, existem achados controversos. A ausência do aumento de marcadores de estresse oxidativo no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos submetidos a administração de AMPH (2 mg/kg i.p.) também já foi observada, com efeito oposto do tratamento com lítio (FREY et al., 2006d). Um estudo do nosso grupo demonstrou que a administração de lisdexanfetamina (LDX) não causou um aumento de citocinas inflamatórias (BRISTOT et al., 2019), como havia sido demonstrado previamente (VALVASSORI et al., 2015). Ainda, a LDX promoveu um aumento das concentrações séricas de BDNF, atribuído pelos autores a um mecanismo compensatório a toxicidade da mesma, sem efeito do tratamento com lítio – o que também diverge da literatura (FREY et al., 2006c). Lan e Einat (2019) avaliaram o efeito de uma ou repetidas doses de AMPH e lítio em diferentes linhagens de camundongos mais utilizados como modelos animais de TB. Além da limitada validade de face, este estudo demonstrou uma dificuldade na reprodutibilidade dos achados neste modelo, principalmente quanto a validade preditiva. Nas duas linhagens de camundongos avaliadas (CD-1 e *black swiss*), a AMPH (1 mg/kg i.p.) foi capaz de induzir hiperatividade, mas o tratamento com lítio não foi capaz de reverter este parâmetro. Portanto, mais estudos que avaliem a utilização deste modelo animal como representativo do TB precisam ser realizados.

Além da observação dos achados da literatura descritos no soro ou encéfalo (vide Tabelas 2-4), a avaliação da correspondência (ou não) entre os mesmos também deve ser considerada. Como descrito anteriormente, a comunicação dos compartimentos periférico e central modulada pela integridade da BHE pode ser considerada um novo mecanismo fisiopatológico a ser estudado. No Artigo científico I, não foram observadas alterações similares nos níveis de BDNF e TBARS no soro e no hipocampo, mas o aumento de citocinas periféricas após o protocolo combinado do modelo crônico de depressão poderia ser suficiente para causar ruptura da estrutura da BHE, o que poderá ser analisado em estudos futuros. Embora não tenham sido observados danos a BHE no modelo animal de mania utilizado do Artigo científico II, a literatura sugere que haja uma comunicação entre o compartimento periférico e o central que é facilitada em condições não fisiológicas. No caso do TB, a toxicidade sistêmica, já demonstrada em diversos estudos (FERRARI et al., 2018; KAPCZINSKI et al., 2010; WOLLENHAUPT-AGUIAR et al., 2016) poderia levar a uma diminuição na estabilidade das *tight junctions* – principais responsáveis por manter a estrutura e função da BHE intactas para proteção do parênquima cerebral à entrada de compostos neurotóxicos. Portanto, o aumento na

permeabilidade da BHE e o envolvimento com alterações observadas nos transtornos de humor ainda é uma hipótese a ser validada (PATEL; FREY, 2015).

Dentre as hipóteses de como a disfunção da BHE estaria implicada na fisiopatologia dos transtornos de humor está o envolvimento da inflamação, principalmente pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias – TNF α , IL-1 β , e IL-6 – que já foi descrito *in vivo* e *in vitro* (GÓMEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; HURTADO-ALVARADO et al., 2016). Ainda, consequências do processo inflamatório, como a formação excessiva de EROs e ERNs, são importantes mediadores de ruptura da BHE. Entre as alterações estruturais já descritas estão invaginações na membrana plasmática das BECs que compõe a BHE observadas no hipocampo de ratos submetidos a 10 dias de privação de sono (GÓMEZ-GONZÁLEZ et al., 2013). Acredita-se que esta disfunção celular observada seja resultado da presença de EROs que, como mencionado, oxidam lipídios de membrana e proteínas contribuindo para disfunção celular e até mesmo apoptose (HURTADO-ALVARADO et al., 2016). Ainda, EROs são considerados tanto promotores como produtos da ativação da resposta imunológica, sugerindo novamente um papel central da inflamação. Banks e cols. (2015) reportam que a BHE é razoavelmente resistente aos danos causados pelo LPS. Porém, a administração de LPS (3 mg/kg i.p.) foi capaz de aumentar a permeabilidade da BHE em diversas regiões cerebrais, incluindo córtex frontal e hipocampo. O tratamento com um inibidor da ciclo-oxigenase – importante enzima mediadora da inflamação – indicou que este pode ser o mecanismo que resulta no efeito delétero do LPS sobre a BHE (BANKS et al., 2015; CANDELARIO-JALIL et al., 2007). A ativação microglial e astrocitária também contribui para o aumento da permeabilidade. Níveis séricos elevados de S100 β – proteína astrocitária considerada exclusiva do SNC – parece ser um importante marcador de integridade da BHE sendo observado em modelo animal e pacientes com epilepsia (BARGERSTOCK et al., 2014). Compostos como a metanfetamina também são promotores do rompimento da BHE, mas os mecanismos pelo qual exercem este efeito é via ativação de metaloproteinases, enzimas que degradam as *tight junctions* (O'SHEA et al., 2014). Ressaltamos, portanto, a importância de considerar a BHE como um importante componente da comunicação do eixo periférico-central na fisiopatologia dos transtornos de humor.

Curiosamente, a EX-4, agonista GLP-1r, já se demonstrou eficaz em reverter o aumento de permeabilidade da BHE na região do hipocampo de modelos animais de diabetes (KUROKI et al., 2016; ZANOTTO et al., 2017). Em adição ao seu potente efeito hipoglicemiante periférico, os agonistas de GLP-1r são capazes de atravessar a BHE e exercer efeitos em nível

central, como na promoção da saciedade (KASTIN; AKERSTROM, 2003). No entanto, recentemente, seus efeitos neuroprotetores vem ganhando interesse na pesquisa. A neuroinflamação é um processo desencadeado principalmente pela ativação dos macrófagos residentes do SNC, ou seja, a microglia. O desequilíbrio entre os perfis pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2) é o principal fator que contribui para o aumento desta resposta inflamatória. Entre os possíveis alvos de modulação estão os GLP-1r. O efeito anti-inflamatório dos agonistas de GLP-1r ainda não está completamente elucidado, mas a ativação da via de PI3k/Akt é capaz de regular a expressão de NFkB. Além disso, frente a ativação microglial, evidências sugerem que os análogos de GLP-1 sejam capazes de suprimir o fenótipo M1 – pró-inflamatório e citotóxico – e favorecer o M2 – anti-inflamatório (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016).

Portanto, no Artigo científico III, foi investigado o potencial efeito neuroprotetor da EX-4 utilizando três diferentes doses. Assim, foram avaliados parâmetros inflamatório, neurotrófico e de estresse oxidativo em um modelo de inflamação aguda induzida por LPS. Um aumento das concentrações séricas e hipocâmpais de IL-6 foi observado nos animais administrados com LPS e, após o tratamento com EX-4, observamos um importante efeito anti-inflamatório central da maior dose. Apesar de não observadas diferenças nas concentrações de TBARS séricas e hipocâmpais após a injeção de LPS, a maior dose de EX-4 também diminuiu a peroxidação lipídica periférica. Os níveis séricos e centrais de BDNF estavam reduzidos nos animais administrados com LPS, mas nenhuma dose de EX-4 exerceu uma melhora significativa deste parâmetro. Os mecanismos envolvidos na ação antioxidante da EX-4 parecem ser os mesmo que se acredita promoverem o efeito anti-inflamatório. A ativação do GLP-1r leva a estimulação de cAMP, PI3k e PKC γ , bem como ativa Nrf-2 (OH; JUN, 2017). Estas vias estão relacionadas ao equilíbrio entre o aumento de mecanismos antioxidantes – principalmente PKC γ – e anti-apoptóticos, bem como à redução de radicais livres e fatores pró-apoptóticos. A ativação de AMPc além de ativar MAPK favorecem a proliferação celular e plasticidade sináptica, e levam à ativação de canais de cálcio – processo que no SNC é essencial para a liberação de neurotransmissores (ATHAUDA; FOLTYNIE, 2016; HUNTER; HÖLSCHER, 2012). A expressão de GLP-1r no encéfalo é observada principalmente em neurônios em diversas regiões, incluindo hipotálamo e hipocampo, tanto em humanos como em roedores (ALVAREZ et al., 2005; CORK et al., 2015). Assim, a presença deste receptor no hipocampo e na zona subventricular – região hipocâmpal de intensa proliferação neuronal – indica que a EX-4 seja capaz de promover neurogênese e diferenciação celular como já observado *in vitro* (LUCIANI

et al., 2010). Devido ao potencial anti-inflamatório da EX-4 observado no Artigo científico IV e dos achados congruentes na literatura, acreditamos no efeito promissor deste peptídeo e que mais estudos deverão ser realizados a fim de replicar estes resultados. Ainda, será importante avaliar os efeitos do tratamento em modelos animais crônicos como os de estresse, o que permitirá a validação do potencial antidepressivo dos agonistas de GLP-1r.

O reconhecimento dos transtornos de humor como doenças multi-sistêmicas é resultado da sua fisiopatologia complexa e multifatorial, que dificulta por muitas vezes o seu diagnóstico e a eficácia dos tratamentos farmacológicos usuais. Apesar disso, de forma geral, evidências pré-clínicas e clínicas acerca destes transtornos reportam aumento de citocinas pró- e anti-inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo, bem como redução de concentrações de BDNF, tanto em nível periférico quanto central. Entretanto, algumas limitações e divergências de achados ainda são observadas em ambas abordagens pré-clínica e clínica. Metodologicamente, em ambos os tipos de estudos, as dosagens periféricas destes parâmetros podem ser realizadas tanto no soro quanto no plasma, o que permite a comparação dos achados e uma abordagem translacional dos mesmos. Entretanto, ao analisar as Tabelas 2-4, é possível identificar que são poucos os estudos com modelos animais que avaliam os parâmetros de interesse na periferia – na qual majoritariamente as avaliações em pacientes é realizada. A falta da correlação periférico-central dificulta o entendimento das alterações bioquímicas periféricas e o seu efeito no SNC, que geralmente resulta em mudanças comportamentais. Na clínica, um dos fatores limitantes é a dificuldade de quantificar alterações em nível central, mais especificamente teciduais – que atualmente só é possível em estudos *post mortem*. Assim, os modelos animais permitem que parâmetros centrais possam ser analisados e extrapolados para a clínica. Neste sentido, nosso trabalho buscou avaliar alterações periférico-centrais de parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo em modelos de transtornos de humor, sugerindo que a intensidade da comunicação destes compartimentos seja mediada pela integridade da BHE. Desta forma, a utilização de modelos animais que satisfaçam os critérios de validades e que sejam translacionais contribui para o desenvolvimento da pesquisa pré-clínica e clínica na Psiquiatria.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A complexidade dos transtornos de humor é inegável e a tentativa de mimetiza-los em modelos animais é desafiadora. Apesar das limitações deste trabalho, como a falta de avaliação de vias de sinalização envolvidas e de validade preditiva, acredita-se que o mesmo tenha contribuído para gerar novas hipóteses acerca da fisiopatologia dos transtornos de humor, bem como sugerir a modulação de novos alvos moleculares para o seu tratamento. Atualmente, a pergunta que fica sem resposta é quanto ao biomarcador ideal para os transtornos psiquiátricos (TEIXEIRA et al., 2019). Embora, a inflamação, as neurotrofinas e o estresse oxidativo sejam importantes na fisiopatologia e na resposta terapêutica, as alterações destes parâmetros não são específicas destes transtornos.

Na figura 8, estão descritos os principais achados desta tese. Conforme observado, a inflamação tem um papel central importante como mediadora das alterações observadas nos transtornos de humor, sendo capaz de gerar estresse oxidativo e reduzir os efeitos neurotróficos do BDNF; assim como nos modelos animais está associada ao surgimento do comportamento tipo-depressivo (DANTZER et al., 2008b). Logo, a inflamação periférica pode ser um importante facilitador da comunicação do eixo periférico-central, já que pode ser capaz de promover o aumento da permeabilidade da BHE – parâmetro que também deve ser avaliado quando possível em modelos animais. Ainda, a identificação de um efeito anti-inflamatório da EX-4 consistiu em um importante achado deste trabalho e que permitirá a sua utilização em modelos animais crônicos – como do LPS seguido de estresse crônico –, gerando um melhor entendimento do seu potencial terapêutico. Estas são perspectivas que, de alguma forma, culminam na busca da melhora da qualidade de vida dos indivíduos com transtornos de humor.

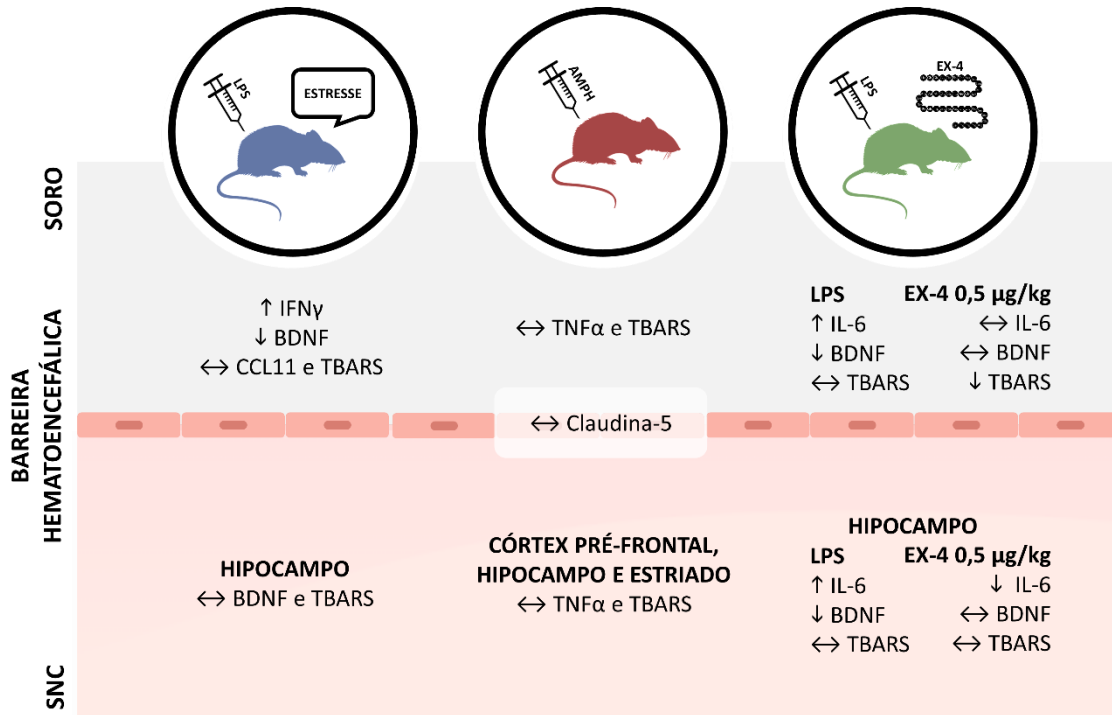


Figura 8. Resumo dos achados encontrados nos modelos animais utilizados. Descrição das alterações encontradas em parâmetros inflamatórios, neurotróficos e de estresse oxidativo no soro e em diferentes estruturas cerebrais; bem como de marcador de integridade da BHE.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 41–53, jan. 2006.

ALBORNOZ, E. A.; WOODRUFF, T. M.; GORDON, R. Inflammasomes in CNS Diseases. **Experientia Supplementum (2012)**, v. 108, p. 41–60, 2018.

ALLAMAN, I. et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor is not modulated by chronic mild stress in the rat hippocampus and amygdala. **Pharmacological reports: PR**, v. 60, n. 6, p. 1001–1007, dez. 2008.

ALVAREZ, E. et al. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. **Journal of Neurochemistry**, v. 92, n. 4, p. 798–806, fev. 2005.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)**. [s.l.] American Psychiatric Pub, 2013.

ANDERSON, G. et al. Bipolar Disorder: The Role of the Kynurenine and Melatonergic Pathways. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 8, p. 987–1012, 2016.

ANISMAN, H. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 34, n. 1, p. 4–20, jan. 2009.

ANISMAN, H.; HAYLEY, S. Inflammatory factors contribute to depression and its comorbid conditions. **Science Signaling**, v. 5, n. 244, p. pe45, 2 out. 2012.

ARNONE, D. et al. Role of Kynurenine pathway and its metabolites in mood disorders: A systematic review and meta-analysis of clinical studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 92, p. 477–485, 2018.

ATHAUDA, D. et al. Exenatide once weekly versus placebo in Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 390, n. 10103, p. 1664–1675, 7 out. 2017.

ATHAUDA, D. et al. What Effects Might Exenatide have on Non-Motor Symptoms in Parkinson's Disease: A Post Hoc Analysis. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 8, n. 2, p. 247–258, 2018.

ATHAUDA, D.; FOLTYNIE, T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 5, p. 802–818, 1 maio 2016.

ATHAUDA, D.; FOLTYNIE, T. Protective effects of the GLP-1 mimetic exendin-4 in Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 136, n. Pt B, p. 260–270, 01 2018.

AUDET, M.-C. et al. Cytokine variations and mood disorders: influence of social stressors and social support. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, 16 dez. 2014.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 238–258, abr. 2012.

BAGOT, R. C. et al. Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 281–295, set. 2014.

BANKS, W. A. et al. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, 25 nov. 2015.

BAO, A.-M.; SWAAB, D. F. The human hypothalamus in mood disorders: The HPA axis in the center. **IBRO Reports**, v. 6, p. 45–53, 1 jun. 2019.

BARGERSTOCK, E. et al. Is peripheral immunity regulated by blood-brain barrier permeability changes? **PloS One**, v. 9, n. 7, p. e101477, 2014.

BARUA, C. C. et al. Zanthoxylum alatum abrogates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviours in mice by modulating neuroinflammation and monoamine neurotransmitters in the hippocampus. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 245–252, 23 mar. 2018.

BAY-RICHTER, C. et al. Changes in behaviour and cytokine expression upon a peripheral immune challenge. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 193–199, 12 set. 2011.

BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; FREY, B. N. Preclinical and Clinical Evidence of Antioxidant Effects of Antidepressant Agents: Implications for the Pathophysiology of Major Depressive Disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

BEIRAMI, E. et al. Intranasal insulin treatment alleviates methamphetamine induced anxiety-like behavior and neuroinflammation. **Neuroscience Letters**, v. 660, p. 122–129, 1 nov. 2017.

BENGESSER, S. A. et al. Mood Stabilizers, Oxidative Stress and Antioxidative Defense in Euthymia of Bipolar Disorder. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 15, n. 4, p. 381–389, 2016.

BENNETT, M. R.; LAGOPOULOS, J. Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression. **Progress in Neurobiology**, v. 112, p. 80–99, jan. 2014.

BEYER, D. K. E.; FREUND, N. Animal models for bipolar disorder: from bedside to the cage. **International Journal of Bipolar Disorders**, v. 5, 13 out. 2017.

BHAGWAGAR, Z. et al. Low GABA concentrations in occipital cortex and anterior cingulate cortex in medication-free, recovered depressed patients. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 255–260, mar. 2008.

BIAN, Y. et al. Learning, memory, and glial cell changes following recovery from chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**, v. 88, n. 5, p. 471–476, 1 ago. 2012.

BJÖRKHOLM, C.; MONTEGGIA, L. M. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 72–79, mar. 2016.

BLACK, C. N. et al. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164–175, jan. 2015.

BLUTHÉ, R. M. et al. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. **Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie**, v. 317, n. 6, p. 499–503, jun. 1994.

BOHANNON, J. K. et al. The immunobiology of toll-like receptor 4 agonists: from endotoxin tolerance to immunoadjuvants. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 40, n. 6, p. 451–462, dez. 2013.

BOND, D. J. et al. Association of peripheral inflammation with body mass index and depressive relapse in bipolar disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 65, p. 76–83, mar. 2016.

BRADY, R. O. et al. Brain gamma-aminobutyric acid (GABA) abnormalities in bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 15, n. 4, p. 434–439, jun. 2013.

BRISTOT, G. et al. Effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in a lisdexamfetamine animal model of mania. **Revista Brasileira De Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, p. e1, 7 mar. 2019.

BRUDER, G. E. et al. Neurocognitive predictors of antidepressant clinical response. **Journal of Affective Disorders**, v. 166, p. 108–114, set. 2014.

BRUNONI, A. R.; LOPES, M.; FREGNI, F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 8, p. 1169–1180, dez. 2008.

CAMKURT, M. A. et al. Evaluation of malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase activity and their diagnostic value in drug naïve, first episode, non-smoker major depression patients and healthy controls. **Psychiatry Research**, v. 238, p. 81–85, 30 abr. 2016.

CANDELARIO-JALIL, E. et al. Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 4, p. 1108–1120, fev. 2007.

CAO, B. et al. Hippocampal volume and verbal memory performance in late-stage bipolar disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 73, p. 102–107, fev. 2016.

CAPURON, L. et al. Depressive symptoms and metabolic syndrome: is inflammation the underlying link? **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 10, p. 896–900, 15 nov. 2008.

CARSON, M. J. et al. CNS immune privilege: hiding in plain sight. **Immunological reviews**, v. 213, p. 48–65, out. 2006.

CASTRÉN, E.; ANTILA, H. Neuronal plasticity and neurotrophic factors in drug responses. **Molecular psychiatry**, v. 22, n. 8, p. 1085–1095, ago. 2017.

CASTRÉN, E.; KOJIMA, M. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. **Neurobiology of Disease**, v. 97, n. Pt B, p. 119–126, 2017.

CATTANEO, A. et al. The human BDNF gene: peripheral gene expression and protein levels as biomarkers for psychiatric disorders. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 11, p. e958, nov. 2016.

CHATTERJEE, S. Chapter Two - Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In: DZIUBLA, T.; BUTTERFIELD, D. A. (Eds.). . **Oxidative Stress and Biomaterials**. [s.l.] Academic Press, 2016. p. 35–58.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 98, 3 jun. 2014.

CHMIELA, M.; MISZCZYK, E.; RUDNICKA, K. Structural modifications of Helicobacter pylori lipopolysaccharide: an idea for how to live in peace. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 29, p. 9882–9897, 7 ago. 2014.

CORK, S. C. et al. Distribution and characterisation of Glucagon-like peptide-1 receptor expressing cells in the mouse brain. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 10, p. 718–731, 5 ago. 2015.

COUCH, Y. et al. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 108, 16 2016.

CRADDOCK, N.; FORTY, L. Genetics of affective (mood) disorders. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 14, n. 6, p. 660–668, jun. 2006.

CRONKITE, R. C. et al. Life stressors and resources and the 23-year course of depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 150, n. 2, p. 370–377, 5 set. 2013.

CZÉH, B. et al. Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293–310, 4 jan. 2016.

DANTZER, R. How do cytokines say hello to the brain? Neural versus humoral mediation. **European Cytokine Network**, v. 5, n. 3, p. 271–273, jun. 1994.

DANTZER, R. et al. Molecular basis of sickness behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 856, p. 132–138, 29 set. 1998.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 933, p. 222–234, mar. 2001.

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

DANTZER, R. et al. Identification and treatment of symptoms associated with inflammation in medically ill patients. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 1, p. 18–29, jan. 2008b.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunology and allergy clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 247–264, maio 2009.

DASKALAKIS, N. P. et al. Early Life Stress Effects on Glucocorticoid-BDNF Interplay in the Hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, p. 68, 2015.

DE MELO, L. G. P. et al. Shared metabolic and immune-inflammatory, oxidative and nitrosative stress pathways in the metabolic syndrome and mood disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 78, p. 34–50, 01 2017.

DE OLIVEIRA, G. S. et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. **Journal of Psychiatric Research**, v. 43, n. 14, p. 1171–1174, set. 2009.

DE SOUSA, R. T. et al. Challenging Treatment-Resistant Major Depressive Disorder: A Roadmap for Improved Therapeutics. **Current Neuropharmacology**, v. 13, n. 5, p. 616–635, set. 2015.

DOUGLAS, K. M. et al. Prevalence of cognitive impairment in major depression and bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, 18 jan. 2018.

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

DURING, M. J. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. **Nature Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1173–1179, set. 2003.

DWIVEDI, T.; ZHANG, H. Lithium-induced neuroprotection is associated with epigenetic modification of specific BDNF gene promoter and altered expression of apoptotic-regulatory proteins. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, 14 jan. 2015.

EBNER, K.; SINGEWALD, N. Individual differences in stress susceptibility and stress inhibitory mechanisms. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, Stress and behavior. v. 14, p. 54–64, 1 abr. 2017.

EFREMOVA, L. et al. Switching from astrocytic neuroprotection to neurodegeneration by cytokine stimulation. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 231–246, jan. 2017.

ELGARF, A.-S. A. et al. Lipopolysaccharide repeated challenge followed by chronic mild stress protocol introduces a combined model of depression in rats: reversibility by imipramine and pentoxifylline. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 126, p. 152–162, nov. 2014.

ENG, J. et al. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7402–7405, 15 abr. 1992.

ERICKSON, M. A.; BANKS, W. A. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide: multiplex quantification with path analysis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 8, p. 1637–1648, nov. 2011.

ERICKSON, M. A.; BANKS, W. A. Neuroimmune Axes of the Blood-Brain Barriers and Blood-Brain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 278–314, 2018.

FAGGIONI, R.; BENIGNI, F.; GHEZZI, P. Proinflammatory cytokines as pathogenetic mediators in the central nervous system: brain-periphery connections. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, n. 1, p. 2–15, fev. 1995.

FAN, C. et al. Curcumin Protects Against Chronic Stress-induced Dysregulation of Neuroplasticity and Depression-like Behaviors via Suppressing IL-1 β Pathway in Rats. **Neuroscience**, v. 392, p. 92–106, 10 2018.

FEE, C.; BANASR, M.; SIBILLE, E. Somatostatin-positive GABA Interneuron Deficits in Depression: Cortical Microcircuit and Therapeutic Perspectives. **Biological psychiatry**, v. 82, n. 8, p. 549–559, 15 out. 2017.

FELGER, J. C. Imaging the Role of Inflammation in Mood and Anxiety-related Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 5, p. 533–558, 2018.

FERNANDEZ-PUJALS, A. M. et al. Epidemiology and Heritability of Major Depressive Disorder, Stratified by Age of Onset, Sex, and Illness Course in Generation Scotland: Scottish Family Health Study (GS:SFHS). **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 16 nov. 2015.

FERRANTE, C. J.; LEIBOVICH, S. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 1, n. 1, p. 10–16, fev. 2012.

FERRARI, P. et al. Depression and Mania Induce Pro-inflammatory Activation of Macrophages Following Application of Serum from Individuals with Bipolar Disorder. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience: The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 103–108, 28 fev. 2018.

FILIANO, A. J.; GADANI, S. P.; KIPNIS, J. How and why do T cells and their derived cytokines affect the injured and healthy brain? **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 375–384, 2017.

FISCHER, C. W. et al. Chronic lipopolysaccharide infusion fails to induce depressive-like behaviour in adult male rats. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 27, n. 3, p. 189–194, jun. 2015.

FLESHNER, M.; FRANK, M.; MAIER, S. F. Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 36–45, jan. 2017.

FLINT, J.; KENDLER, K. S. The genetics of major depression. **Neuron**, v. 81, n. 3, p. 484–503, 5 fev. 2014.

FRANCO, R.; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 131, p. 65–86, ago. 2015.

FREY, B. N. et al. Changes in antioxidant defense enzymes after d-amphetamine exposure: implications as an animal model of mania. **Neurochemical Research**, v. 31, n. 5, p. 699–703, maio 2006a.

FREY, B. N. et al. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as a model of mania. **Bipolar Disorders**, v. 8, n. 3, p. 275–280, 1 jun. 2006b.

FREY, B. N. et al. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Sciences**, v. 79, n. 3, p. 281–286, 13 jun. 2006c.

FREY, B. N. et al. Effects of lithium and valproate on amphetamine-induced oxidative stress generation in an animal model of mania. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 31, n. 5, p. 326–332, set. 2006d.

FRIES, G. R. et al. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction and Illness Progression in Bipolar Disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 1, 15 dez. 2014.

FRIES, G. R. et al. Memory and brain-derived neurotrophic factor after subchronic or chronic amphetamine treatment in an animal model of mania. **Journal of Psychiatric Research**, v. 68, p. 329–336, set. 2015.

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, 15 2017.

GAWRYLUK, J. W. et al. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 123–130, fev. 2011.

GOMES, L. M. et al. Omega-3 fatty acids and mood stabilizers alter behavioral and oxidative stress parameters in animals subjected to fenproporex administration. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 2, p. 519–528, 2017.

GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. et al. REM sleep loss and recovery regulates blood-brain barrier function. **Current Neurovascular Research**, v. 10, n. 3, p. 197–207, ago. 2013.

GUBERT, C. et al. Role of P2X7 Receptor in an Animal Model of Mania Induced by D-Amphetamine. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 1, p. 611–620, jan. 2016.

HAAPAKOSKI, R. et al. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1 β , tumour necrosis factor α and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 49, p. 206–215, out. 2015.

HAARMAN, B. C. M. B. et al. Neuroinflammation in bipolar disorder - A [(11)C]-(R)-PK11195 positron emission tomography study. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 40, p. 219–225, ago. 2014.

HAARMAN, B. C. M. “BENNO” et al. Volume, metabolites and neuroinflammation of the hippocampus in bipolar disorder - A combined magnetic resonance imaging and positron emission tomography study. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 56, p. 21–33, ago. 2016.

HAASE, J.; BROWN, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression--a central role for the serotonin transporter? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 147, p. 1–11, mar. 2015.

HAROON, E. et al. Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 95, p. 43–49, 1 set. 2018.

HAROON, E.; MILLER, A. H. Inflammation Effects on Brain Glutamate in Depression: Mechanistic Considerations and Treatment Implications. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 31, p. 173–198, 2017.

HAROON, E.; RAISON, C. L.; MILLER, A. H. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 137–162, jan. 2012.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123–137, 1988.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1310–1316, 1 dez. 2007.

HENINGER, G. R.; DELGADO, P. L.; CHARNEY, D. S. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. **Pharmacopsychiatry**, v. 29, n. 1, p. 2–11, jan. 1996.

HENTER, I. D. et al. Mood Therapeutics: Novel Pharmacological Approaches for Treating Depression. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 153–166, fev. 2017.

HILL, M. N. et al. Neurobiology of chronic mild stress: parallels to major depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 9, p. 2085–2117, out. 2012.

HODES, A. et al. Reduction in endogenous cardiac steroids protects the brain from oxidative stress in a mouse model of mania induced by amphetamine. **Brain Research Bulletin**, v. 137, p. 356–362, 2018.

HOSANG, G. M. et al. Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. **BMC Medicine**, v. 12, p. 7, 16 jan. 2014.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. **Annual review of neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.

HUNTER, K.; HÖLSCHER, C. Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. **BMC neuroscience**, v. 13, p. 33, 23 mar. 2012.

HURTADO-ALVARADO, G. et al. Blood-Brain Barrier Disruption Induced by Chronic Sleep Loss: Low-Grade Inflammation May Be the Link. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

ISACSON, R. et al. The glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 improves reference memory performance and decreases immobility in the forced swim test. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 249–255, 10 jan. 2011.

JANGRA, A. et al. Sodium Phenylbutyrate and Edaravone Abrogate Chronic Restraint Stress-Induced Behavioral Deficits: Implication of Oxido-Nitrosative, Endoplasmic Reticulum Stress Cascade, and Neuroinflammation. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 37, n. 1, p. 65–81, jan. 2017.

JANGRA, A.; SRIRAM, C. S.; LAHKAR, M. Lipopolysaccharide-Induced Behavioral Alterations Are Alleviated by Sodium Phenylbutyrate via Attenuation of Oxidative Stress and Neuroinflammatory Cascade. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1441–1452, 1 ago. 2016.

JEANNETEAU, F. et al. The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 1373–1379, nov. 2010.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v. 341, p. 79–90, 02 2018.

JIANG, H. et al. The serum protein levels of the tPA-BDNF pathway are implicated in depression and antidepressant treatment. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 4, p. e1079, 04 2017.

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, S. et al. Oxidative stress and antioxidant parameters in patients with major depressive disorder compared to healthy controls before and after antidepressant treatment: results from a meta-analysis. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 76, n. 12, p. 1658–1667, dez. 2015.

KAMBEITZ, J. P.; HOWES, O. D. The serotonin transporter in depression: Meta-analysis of in vivo and post mortem findings and implications for understanding and treating depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 186, p. 358–366, 1 nov. 2015.

KAPCZINSKI, F. et al. Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 8, n. 7, p. 1101–1113, jul. 2008.

KAPCZINSKI, F. et al. A systemic toxicity index developed to assess peripheral changes in mood episodes. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 8, p. 784–786, ago. 2010.

KASTIN, A. J.; AKERSTROM, V. Entry of exendin-4 into brain is rapid but may be limited at high doses. **International Journal of Obesity**, v. 27, n. 3, p. 313–318, mar. 2003.

KAUER-SANT'ANNA, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 447–458, maio 2009.

KELLER, J. et al. HPA Axis in Major Depression: Cortisol, Clinical Symptomatology, and Genetic Variation Predict Cognition. **Molecular psychiatry**, v. 22, n. 4, p. 527–536, abr. 2017.

KELLY, J. R. et al. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, 14 out. 2015.

KEMP, D. E. et al. Medical comorbidity in bipolar disorder: relationship between illnesses of the endocrine/metabolic system and treatment outcome. **Bipolar Disorders**, v. 12, n. 4, p. 404–413, jun. 2010.

KENDLER, K. S.; THORNTON, L. M.; GARDNER, C. O. Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. **The American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 4, p. 582–586, abr. 2001.

KERNER, B. Toward a Deeper Understanding of the Genetics of Bipolar Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, p. 105, 2015.

KHALLAF, W. A. I. et al. Protective effects of telmisartan and tempol on lipopolysaccharide-induced cognitive impairment, neuroinflammation, and amyloidogenesis: possible role of brain-derived neurotrophic factor. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 95, n. 7, p. 850–860, 7 abr. 2017.

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, maio 2017.

KOO, J. W. et al. Nuclear factor- κ B is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2669–2674, 9 fev. 2010.

KRAUS, C. et al. Serotonin and neuroplasticity - Links between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 77, p. 317–326, 2017.

KULIKOV, A. V. et al. Interplay between the key proteins of serotonin system in SSRI antidepressants efficacy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 22, n. 4, p. 319–330, 2018.

KUROKI, T. et al. Exendin-4 Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Activation and Reduces Infarct Growth After Focal Cerebral Ischemia in Hyperglycemic Mice. **Stroke**, v. 47, n. 5, p. 1328–1335, 2016.

LAN, A.; EINAT, H. Questioning the predictive validity of the amphetamine-induced hyperactivity model for screening mood stabilizing drugs. **Behavioural Brain Research**, v. 362, p. 109–113, 19 abr. 2019.

LANQUILLON, S. et al. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 4, p. 370–379, abr. 2000.

LARSEN, M. H. et al. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 13, p. 808–816, 1 out. 2010.

LAU, J. Y. F.; ELEY, T. C. The genetics of mood disorders. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 6, p. 313–337, 2010.

LEAL, G.; BRAMHAM, C. R.; DUARTE, C. B. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Vitamins and Hormones**, v. 104, p. 153–195, 2017.

LEE, S.-Y. et al. The correlation between plasma brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in bipolar disorder is modulated by the BDNF Val66Met polymorphism. **Scientific Reports**, v. 6, 1 dez. 2016.

LEE, Y. et al. Anti-cytokine agents for anhedonia: targeting inflammation and the immune system to treat dimensional disturbances in depression. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 337–348, dez. 2018.

LEVINSTEIN, M. R.; SAMUELS, B. A. Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 208, 2014.

LI, H. et al. Senegenin exerts anti-depression effect in mice induced by chronic un-predictable mild stress via inhibition of NF- κ B regulating NLRP3 signal pathway. **International Immunopharmacology**, v. 53, p. 24–32, dez. 2017.

- LI, R. et al. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience Letters**, v. 594, p. 17–22, 6 maio 2015.
- LIMA GIACOBBO, B. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, 17 ago. 2018.
- LINDQVIST, D. et al. Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 76, p. 197–205, fev. 2017.
- LIU, H. et al. The Metabolic Factor Kynurenic Acid of Kynurenine Pathway Predicts Major Depressive Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, 19 nov. 2018.
- LIU, T. et al. A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. e0138904, 2015.
- LIU, T. et al. Similar profiles of cognitive domain deficits between medication-naïve patients with bipolar II depression and those with major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 243, p. 55–61, 15 2019.
- LIU, Y.; ZHAO, J.; GUO, W. Emotional Roles of Mono-Aminergic Neurotransmitters in Major Depressive Disorder and Anxiety Disorders. **Frontiers in Psychology**, v. 9, p. 2201, 2018.
- LOUVEAU, A.; HARRIS, T. H.; KIPNIS, J. Revisiting the concept of CNS immune privilege. **Trends in immunology**, v. 36, n. 10, p. 569–577, out. 2015.
- LUCASSEN, P. J. et al. Neuropathology of stress. **Acta Neuropathologica**, v. 127, n. 1, p. 109–135, 2014.
- LUCIANI, P. et al. Differentiating effects of the glucagon-like peptide-1 analogue exendin-4 in a human neuronal cell model. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 67, n. 21, p. 3711–3723, nov. 2010.
- LUGRIN, J. et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 2, p. 203–230, fev. 2014.
- LUO, Y. et al. cAMP/PKA-CREB-BDNF signaling pathway in hippocampus mediates cyclooxygenase 2-induced learning/memory deficits of rats subjected to chronic unpredictable mild stress. **Oncotarget**, v. 8, n. 22, p. 35558–35572, 8 mar. 2017.

LUSCHER, B.; SHEN, Q.; SAHIR, N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 4, p. 383–406, abr. 2011.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 2, p. 142–144, 15 jan. 2007.

MADDISON, D. C.; GIORGINI, F. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 40, p. 134–141, abr. 2015.

MAES, M. et al. Disturbances in acute phase plasma proteins during melancholia: additional evidence for the presence of an inflammatory process during that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 16, n. 4, p. 501–515, jul. 1992.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676–692, 29 abr. 2011.

MAHMOUD, S. et al. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. **Cells**, v. 8, n. 2, 20 fev. 2019.

MAO, M. et al. Two-hit model of postintensive care syndrome induced by lipopolysaccharide challenge and subsequent chronic unpredictable stress in mice. **International Immunopharmacology**, v. 70, p. 446–458, 8 mar. 2019.

MARRIE, R. A. et al. Increased incidence of psychiatric disorders in immune-mediated inflammatory disease. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 101, p. 17–23, 2017.

MARTIN, A. M. et al. The Diverse Metabolic Roles of Peripheral Serotonin. **Endocrinology**, v. 158, n. 5, p. 1049–1063, 01 2017.

MARTINEZ-ARAN, A. et al. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. **Bipolar Disorders**, v. 9, n. 1–2, p. 103–113, mar. 2007.

MARTINOWICH, K.; LU, B. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 73–83, jan. 2008.

MATHUR, A.; HAYWARD, J. A.; MAN, S. M. Molecular mechanisms of inflammasome signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 2, p. 233–257, fev. 2018.

MATYS, T. et al. Tissue plasminogen activator promotes the effects of corticotropin-releasing factor on the amygdala and anxiety-like behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16345–16350, 16 nov. 2004.

MCELROY, S. L. Diagnosing and treating comorbid (complicated) bipolar disorder. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 65 Suppl 15, p. 35–44, 2004.

MELLO, B. S. F. 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, out. 2013.

MENKE, A.; BINDER, E. B. Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 395–404, set. 2014.

MEYER, J. Novel Phenotypes Detectable with PET in Mood Disorders: Elevated Monoamine Oxidase A and Translocator Protein Level. **PET clinics**, v. 12, n. 3, p. 361–371, jul. 2017.

MILLER, A. H. et al. Cytokine Targets in the Brain: Impact on Neurotransmitters and Neurocircuits. **Depression and anxiety**, v. 30, n. 4, p. 297–306, abr. 2013.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. **Biological psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732–741, 1 maio 2009.

MILLER, A. H.; PARIANTE, C. M.; PEARCE, B. D. Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 461, p. 107–116, 1999.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 1, p. 22–34, jan. 2016.

MONJE, M. L.; TODA, H.; PALMER, T. D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5651, p. 1760–1765, 5 dez. 2003.

MORA, E. et al. High BDNF serum levels are associated to good cognitive functioning in bipolar disorder. **European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists**, 23 fev. 2019.

MORRIS, G. et al. Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 7, p. 5767–5786, 2018.

MOTAGHINEJAD, M. et al. Possible involvement of CREB/BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of topiramate against methylphenidate induced apoptosis, oxidative stress and inflammation in isolated hippocampus of rats: Molecular, biochemical and histological evidences. **Brain Research Bulletin**, v. 132, p. 82–98, 2017.

MUNKHOLM, K.; VINBERG, M.; VEDEL KESSING, L. Cytokines in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v. 144, n. 1–2, p. 16–27, 10 jan. 2013.

MUSKIET, M. H. A. et al. GLP-1 and the kidney: from physiology to pharmacology and outcomes in diabetes. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 13, n. 10, p. 605–628, out. 2017.

NAKAGAWA, Y.; CHIBA, K. Role of Microglial M1/M2 Polarization in Relapse and Remission of Psychiatric Disorders and Diseases. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 12, p. 1028–1048, 25 nov. 2014.

NAKAGAWA, Y.; CHIBA, K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 154, p. 21–35, out. 2015.

NEUWELT, E. A. et al. Engaging Neuroscience to Advance Translational Research in Brain Barrier Biology. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 169–182, mar. 2011.

NIMH. **Any Mood Disorder.** Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/any-mood-disorder.shtml>>. Acesso em: 25 jan. 2019a.

NIMH. **Bipolar Disorder.** Disponível em: <<https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/bipolar-disorder.shtml>>. Acesso em: 25 jan. 2019b.

NUERNBERG, G. L. et al. Brain-derived neurotrophic factor increase during treatment in severe mental illness inpatients. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 12, p. e985, 13 2016.

NUMAKAWA, T.; ODAKA, H.; ADACHI, N. Actions of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glucocorticoid Stress in Neurogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2 nov. 2017.

NUNES, P. V. et al. Low brain-derived neurotrophic factor levels in post-mortem brains of older adults with depression and dementia in a large clinicopathological sample. **Journal of Affective Disorders**, v. 241, p. 176–181, 01 2018.

O'CONNOR, J. C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 511–522, maio 2009.

OH, Y. S.; JUN, H.-S. Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Oxidative Stress and Nrf2 Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 22 dez. 2017.

ORTIZ, J. B.; CONRAD, C. D. The impact from the aftermath of chronic stress on hippocampal structure and function: Is there a recovery? **Frontiers in Neuroendocrinology, Stress and the Brain**. v. 49, p. 114–123, 1 abr. 2018.

O'SHEA, E. et al. Current preclinical studies on neuroinflammation and changes in blood-brain barrier integrity by MDMA and methamphetamine. **Neuropharmacology**, v. 87, p. 125–134, dez. 2014.

PACE, T. W. W.; HU, F.; MILLER, A. H. Cytokine-Effects on Glucocorticoid Receptor Function: Relevance to Glucocorticoid Resistance and the Pathophysiology and Treatment of Major Depression. **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 1, p. 9–19, jan. 2007.

PANCHAL, P.; KALTENBOECK, A.; HARMER, C. J. Cognitive emotional processing across mood disorders. **CNS spectrums**, p. 1–10, 15 jan. 2019.

PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 5, p. 391–404, 1 mar. 2001.

PATEL, J. P.; FREY, B. N. Disruption in the Blood-Brain Barrier: The Missing Link between Brain and Body Inflammation in Bipolar Disorder? **Neural Plasticity**, v. 2015, p. 708306, 2015.

PATTEN, S. B. Major depression epidemiology from a diathesis-stress conceptualization. **BMC psychiatry**, v. 13, p. 19, 11 jan. 2013.

PERRY, T. et al. Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 881–888, set. 2002.

PETERSEN, J. Z.; PORTER, R. J.; MISKOWIAK, K. W. Clinical characteristics associated with the discrepancy between subjective and objective cognitive impairment in depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 246, p. 763–774, 27 dez. 2018.

PFAU, M. L.; MÉNARD, C.; RUSSO, S. J. Inflammatory Mediators in Mood Disorders: Therapeutic Opportunities. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 58, p. 411–428, 6 jan. 2018.

PISHVA, E.; RUTTEN, B. P. F.; VAN DEN HOVE, D. DNA Methylation in Major Depressive Disorder. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 978, p. 185–196, 2017.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88–109, jan. 2008.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

POST, R. M. Kindling and sensitization as models for affective episode recurrence, cyclicality, and tolerance phenomena. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 6, p. 858–873, 2007.

QUAN, N.; BANKS, W. A. Brain-immune communication pathways. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 727–735, 1 ago. 2007.

QUEISSNER, R. et al. The relationship between inflammatory state and quantity of affective episodes in bipolar disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 90, p. 61–67, 2018.

RAFIEVA, L. M.; GASANOV, E. V. Neurotrophin Propeptides: Biological Functions and Molecular Mechanisms. **Current Protein & Peptide Science**, v. 17, n. 4, p. 298–305, 2016.

RAMÍREZ, L. A. et al. A new theory of depression based on the serotonin/kynurenine relationship and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud**, v. 38, n. 3, p. 437–450, 01 2018.

ROBSON, M. J.; QUINLAN, M. A.; BLAKELY, R. D. Immune System Activation and Depression: Roles of Serotonin in the Central Nervous System and Periphery. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 932–942, 17 2017.

ROSA, A. R. et al. One-year psychosocial functioning in patients in the early vs. late stage of bipolar disorder. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 125, n. 4, p. 335–341, abr. 2012.

ROSA, A. R. et al. Clinical staging in bipolar disorder: focus on cognition and functioning. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 75, n. 5, p. e450-456, maio 2014a.

ROSA, A. R. et al. Altered plasma glutathione levels in bipolar disorder indicates higher oxidative stress; a possible risk factor for illness onset despite normal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. **Psychological Medicine**, v. 44, n. 11, p. 2409–2418, ago. 2014b.

ROSENBLAT, J. D. et al. Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 53, p. 23–34, 4 ago. 2014.

ROSENBLAT, J. D.; GREGORY, J. M.; MCINTYRE, R. S. Pharmacologic implications of inflammatory comorbidity in bipolar disorder. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 29, p. 63–69, 2016.

ROSENBLAT, J. D.; MCINTYRE, R. S. Bipolar Disorder and Inflammation. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 39, n. 1, p. 125–137, mar. 2016.

RUIZ, N. A. L. et al. Neuroprogression: the hidden mechanism of depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 14, p. 2837–2845, 30 out. 2018.

RUSSELL-JONES, D. The safety and tolerability of GLP-1 receptor agonists in the treatment of type-2 diabetes. **International Journal of Clinical Practice**, v. 64, n. 10, p. 1402–1414, set. 2010.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201–205, jan. 2017.

SANACORA, G. et al. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 705–713, jul. 2004.

SANACORA, G. et al. Targeting the Glutamatergic System to Develop Novel, Improved Therapeutics for Mood Disorders. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 5, p. 426–437, maio 2008.

SASI, M. et al. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. **Pflugers Archiv**, v. 469, n. 5, p. 593–610, 2017.

SAVITZ, J. et al. Neuroprotective kynurenine metabolite indices are abnormally reduced and positively associated with hippocampal and amygdalar volume in bipolar disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 200–211, fev. 2015.

SAYURIYAMAGATA, A. et al. Medical comorbidity in bipolar disorder: The link with metabolic-inflammatory systems. **Journal of Affective Disorders**, v. 211, p. 99–106, 15 mar. 2017.

SCHWARCZ, R. et al. KYNURENINES IN THE MAMMALIAN BRAIN: WHEN PHYSIOLOGY MEETS PATHOLOGY. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 465–477, jul. 2012.

SEGI-NISHIDA, E. The Effect of Serotonin-Targeting Antidepressants on Neurogenesis and Neuronal Maturation of the Hippocampus Mediated via 5-HT1A and 5-HT4 Receptors. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 142, 2017.

SETIAWAN, E. et al. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 3, p. 268–275, mar. 2015.

SHALEV, H.; SERLIN, Y.; FRIEDMAN, A. **Breaching the Blood-Brain Barrier as a Gate to Psychiatric Disorder.** Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/cpn/2009/278531/>>. Acesso em: 11 fev. 2018.

SHARMA, A. N. et al. Modeling mania in preclinical settings: a comprehensive review. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 66, p. 22–34, 3 abr. 2016.

SHELDRIK, A. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) levels in post-mortem brain tissue from patients with depression compared to healthy individuals - a proof of concept study. **European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 46, p. 65–71, 2017.

SHI, S.-S. et al. Acute Stress and Chronic Stress Change Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Tyrosine Kinase-Coupled Receptor (TrkB) Expression in Both Young and Aged Rat Hippocampus. **Yonsei Medical Journal**, v. 51, n. 5, p. 661–671, 1 set. 2010.

SKONIECZNA-ŻYDECKA, K. et al. Microbiome-The Missing Link in the Gut-Brain Axis: Focus on Its Role in Gastrointestinal and Mental Health. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 12, 7 dez. 2018.

ŚLUSARCZYK, J. et al. A Potential Contribution of Chemokine Network Dysfunction to the Depressive Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 7, p. 705–720, 2016.

SMITH, M. A. et al. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 3 Pt 1, p. 1768–1777, mar. 1995.

SONG, J. et al. Bipolar disorder and its relation to major psychiatric disorders: a family-based study in the Swedish population. **Bipolar Disorders**, v. 17, n. 2, p. 184–193, mar. 2015.

SONG, Q. et al. Hippocampal CA1 β CaMKII mediates neuroinflammatory responses via COX-2/PGE2 signaling pathways in depression. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, 8 dez. 2018.

SOWA-KUĆMA, M. et al. Are there differences in lipid peroxidation and immune biomarkers between major depression and bipolar disorder: Effects of melancholia, atypical depression,

severity of illness, episode number, suicidal ideation and prior suicide attempts. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 81, p. 372–383, 2 fev. 2018.

SPERNER-UNTERWEGER, B.; KOHL, C.; FUCHS, D. Immune changes and neurotransmitters: possible interactions in depression? **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 48, p. 268–276, 3 jan. 2014.

STEPANICHEV, M. et al. Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 932757, 2014.

SWARDFAGER, W. et al. Mapping inflammation onto mood: Inflammatory mediators of anhedonia. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 64, p. 148–166, maio 2016.

TACIAK, P. P.; LYSENKO, N.; MAZUREK, A. P. Drugs which influence serotonin transporter and serotonergic receptors: Pharmacological and clinical properties in the treatment of depression. **Pharmacological reports: PR**, v. 70, n. 1, p. 37–46, fev. 2018.

TANIGUTI, E. H. et al. Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Physiology & Behavior**, v. 188, p. 270–275, 01 2018.

TATAY-MANTEIGA, A. et al. Clinical staging and serum cytokines in bipolar patients during euthymia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 77, p. 194–201, 3 jul. 2017.

TEIXEIRA, A. L. et al. Biomarkers for bipolar disorder: current status and challenges ahead. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 19, n. 1, p. 67–81, jan. 2019.

TORRENT, C. et al. Efficacy of functional remediation in bipolar disorder: a multicenter randomized controlled study. **The American Journal of Psychiatry**, v. 170, n. 8, p. 852–859, ago. 2013.

TORRES-PLATAS, S. G. et al. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 42, p. 50–59, nov. 2014.

TRAMONTINA, J. F. et al. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. **Neuroscience Letters**, v. 452, n. 2, p. 111–113, 13 mar. 2009.

TRIVEDI, M. H. et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. **The American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 28–40, jan. 2006.

VALLES-COLOMER, M. et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. **Nature Microbiology**, 4 fev. 2019.

VALVASSORI, S. S. et al. Lithium modulates the production of peripheral and cerebral cytokines in an animal model of mania induced by dextroamphetamine. **Bipolar Disorders**, v. 17, n. 5, p. 507–517, ago. 2015.

VALVASSORI, S. S. et al. The role of neurotrophic factors in manic-, anxious- and depressive-like behaviors induced by amphetamine sensitization: Implications to the animal model of bipolar disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 245, p. 1106–1113, 15 2019.

VAN BLOEMENDAAL, L. et al. GLP-1 receptor activation modulates appetite- and reward-related brain areas in humans. **Diabetes**, v. 63, n. 12, p. 4186–4196, dez. 2014.

VAN DEN AMEELE, S. et al. Markers of Inflammation and Monoamine Metabolism Indicate Accelerated Aging in Bipolar Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 9, 14 jun. 2018.

VANCAMPFORT, D. et al. Risk of metabolic syndrome and its components in people with schizophrenia and related psychotic disorders, bipolar disorder and major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis. **World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 14, n. 3, p. 339–347, out. 2015.

VANCASSEL, S.; CAPURON, L.; CASTANON, N. Brain Kynurenine and BH4 Pathways: Relevance to the Pathophysiology and Treatment of Inflammation-Driven Depressive Symptoms. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, 24 jul. 2018.

VIETA, E. et al. Clinical management and burden of bipolar disorder: results from a multinational longitudinal study (WAVE-bd). **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 8, p. 1719–1732, set. 2013.

VON BOHLEN UND HALBACH, O.; VON BOHLEN UND HALBACH, V. BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. **Cell and Tissue Research**, v. 373, n. 3, p. 729–741, set. 2018.

WANG, B. et al. Antidepressant-like effects of embelin and its possible mechanisms of action in chronic unpredictable stress-induced mice. **Neurological Research**, v. 40, n. 8, p. 666–676, ago. 2018.

WANG, N. et al. Chronic unpredictable stress exacerbates surgery-induced sickness behavior and neuroinflammatory responses via glucocorticoids secretion in adult rats. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e0183077, 2017.

WANG, Y. et al. Inhibition of activated astrocyte ameliorates lipopolysaccharide- induced depressive-like behaviors. **Journal of Affective Disorders**, v. 242, p. 52–59, 1 jan. 2019.

WANG, Z. et al. The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Behavioural Brain Research**, v. 274, p. 282–290, 1 nov. 2014.

WHO, W. H. O. **Global burden of mental disorders and the need for a comprehensive, coordinated response from health and social sectors at the country level.** [s.l: s.n.].

WHO, W. H. O. **Depression and Other Common Mental Disorders - Global Health Estimates**, 2017a.

WHO, W. H. O. **WHO | Depression: let's talk.** Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/management/depression/en/>. Acesso em: 24 fev. 2019b.

WILKINSON, S. T.; SANACORA, G. A new generation of antidepressants: an update on the pharmaceutical pipeline for novel and rapid-acting therapeutics in mood disorders based on glutamate/GABA neurotransmitter systems. **Drug Discovery Today**, 14 nov. 2018.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 78–93, fev. 2017a.

WILLNER, P. Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user survey. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 68–77, fev. 2017b.

WITTCHEN, H.-U. The burden of mood disorders. **Science (New York, N.Y.)**, v. 338, n. 6103, p. 15, 5 out. 2012.

WOLLENHAUPT-AGUIAR, B. et al. Reduced Neurite Density in Neuronal Cell Cultures Exposed to Serum of Patients with Bipolar Disorder. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, 31 maio 2016.

XIA, J. et al. Different effects of immune stimulation on chronic unpredictable mild stress-induced anxiety- and depression-like behaviors depending on timing of stimulation. **International Immunopharmacology**, v. 58, p. 48–56, maio 2018.

YAN, J. et al. Chronic unpredictable stress abrogates the endotoxin tolerance induced by repeated peripheral LPS challenge via the TLR4 signaling pathway. **Neuroscience Letters**, v. 645, p. 7–13, 03 2017.

YOHAN, C. N.; GERGUES, M. M.; SAMUELS, B. A. The role of 5-HT receptors in depression. **Molecular Brain**, v. 10, 24 jun. 2017.

YOU, Z. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: involvement in depression. **Behavioural Brain Research**, v. 225, n. 1, p. 135–141, 20 nov. 2011.

ZALETEL, I.; FILIPOVIĆ, D.; PUŠKAŠ, N. Hippocampal BDNF in physiological conditions and social isolation. **Reviews in the Neurosciences**, v. 28, n. 6, p. 675–692, 26 2017.

ZANOTTO, C. et al. Exendin-4 Reverses Biochemical and Functional Alterations in the Blood-Brain and Blood-CSF Barriers in Diabetic Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 3, p. 2154–2166, abr. 2017.

ANEXO A – OUTRAS PUBLICAÇÕES

Outras publicações relevantes como co-autora durante o período de doutorado incluem 6 artigos científicos e 1 capítulo de livro, sendo eles:

- Artigos científicos publicado em revistas científicas indexadas:

Bristot G, Ascoli BM, Scotton E, Géa LP, Pfaffenseller B, Kauer-Sant'Anna M. Effects of lithium on inflammatory and neurotrophic factors after an immune challenge in a lisdexamfetamine animal model of mania. *Braz J Psychiatry*. 2019 Mar 7:e1. doi: 10.1590/1516-4446-2017-0001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30843957.

Huf F, Bandiera S, Müller CB, Gea L, Carvalho FB, Rahmeier FL, Reiter KC, Tortorelli LS, Gomez R, da Cruz Fernandes M. Comparative study on the effects of cigarette smoke exposure, ethanol consumption and association: Behavioral parameters, apoptosis, glial fibrillary acid protein and S100 β immunoreactivity in different regions of the rat hippocampus. *Alcohol*. 2018 Aug 23;77:101-112. doi: 10.1016/j.alcohol.2018.08.009. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30870710.

Watts D, Pfaffenseller B, Wollenhaupt-Aguiar B, Paul Géa L, Cardoso TA, Kapczinski F. Agmatine as a potential therapeutic intervention in bipolar depression: the preclinical landscape. *Expert Opin Ther Targets*. 2019 Feb 15. doi: 10.1080/14728222.2019.1581764. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30764678.

Ferrari P, Parisi MM, Colombo R, Becker M, Fries G, Ascoli BM, Géa LP, Anna MK, Kapczinski F, Klamt F, Guma FT, Rosa AR, Barbé-Tuana FM. Depression and Mania Induce Pro-inflammatory Activation of Macrophages Following Application of Serum from Individuals with Bipolar Disorder. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2018 Feb 28;16(1):103-108. doi: 10.9758/cpn.2018.16.1.103. PubMed PMID: 29397672; PubMed Central PMCID: PMC5810451.

Ascoli BM, Colombo R, Géa LP, Terraciano PB, Pizzato SB, de Oliveira FS, Cirne-Lima E, Kapczinski F, Rosa AR. Cell therapy in the treatment of bipolar mania in an animal model: a proof of concept study. *Trends Psychiatry Psychother.* 2017 Jul-Sep;39(3):196-201. doi: 10.1590/2237-6089-2016-0074. Epub 2017 May 15. PubMed PMID: 28513760.

Rahmeier FL, Zavalhia LS, Tortorelli LS, Huf F, Géa LP, Meurer RT, Machado AC, Gomez R, Fernandes MDC. The effect of taurine and enriched environment on behaviour, memory and hippocampus of diabetic rats. *Neurosci Lett.* 2016 Sep 6;630:84-92. doi: 10.1016/j.neulet.2016.07.032. Epub 2016 Jul 25. PubMed PMID: 27471162.

- Capítulo de livro

ROSA, A. R.; ASCOLI, B. M.; GÉA, L. P. Farmacologia do Transtorno Bipolar. In: *Farmacologia Clínica*. 1 ed.: Elsevier, 2017, p. 320-.