



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SIMONE HELENA SCHELDER MARZZANI

PARÂMETROS RELACIONADOS À DEPRESSÃO EM ANIMAIS ADULTOS
SUBMETIDOS À ATIVAÇÃO IMUNE NEONATAL

Palhoça
2018

SIMONE HELENA SCHELDER MARZZANI

**PARÂMETROS RELACIONADOS À DEPRESSÃO EM ANIMAIS ADULTOS
SUBMETIDOS À ATIVAÇÃO IMUNE NEONATAL**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde como requisito para a obtenção
do título de Mestra em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Clarissa M. Comin, Dra.

Palhoça

2018

M35 Marzzani, Simone Helena Schelder, 1972-
 Parâmetros relacionados à depressão em animais adultos submetidos
 à ativação imune neonatal / Simone Helena Schelder Marzzani. – 2018.
 55 f. : il. color. ; 30 cm

 Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-
 graduação em Ciências da Saúde.
 Orientação: Profª. Clarissa Martinelli Comim Cassol

 1. Sistema nervoso - Doenças - Tratamento. 2. Depressão mental. 3.
 Endotoxemia. I. Comim, Clarissa Martinelli. II. Universidade do Sul de
 Santa Catarina. III. Título.

 CDD (21. ed.) 616.8



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Avaliação dos parâmetros relacionados à depressão em animais adultos submetidos à ativação imune neonatal

SIMONE HELENA SCHEIDER MARZZANI
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 26 de fevereiro de 2018.

Doutora Clarissa Martinelli Comim (orientador) Clarissa Martinelli Comim

Doutora Jaqueline da Silva Generoso (avaliador externo) Jaqueline Generoso

Doutora Aline Daiane Schlindwein (avaliador interno) Aline Daiane Schlindwein

Professor Doutor Jefferson Traebert
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

RESUMO

Introdução: A fisiopatologia dos transtornos depressivos ainda permanecem não totalmente compreendida. Apesar das contribuições da hipótese monoaminérgica, estudos têm evidenciado o papel da neuroinflamação no desenvolvimento da depressão. A neuroinflamação pode modular significativamente o desenvolvimento encefálico, a regulação imune e endócrina, bem como os circuitos neurais, resultando em mudanças fisiológicas e comportamentais. **Objetivo:** Verificar a associação entre a ativação imune neonatal e parâmetros relacionados a depressão na vida adulta utilizando um modelo animal. **Métodos:** animais C57BL/6 com dois dias de vida foram expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) ou tampão fosfato salina (PBS) e aos 46 dias de vida, receberam PBS ou Imipramina durante 14 dias. Ao completarem 60 dias de vida, foram avaliados o consumo de sacarose; o tempo de imobilidade; o peso ponderal, da glândula adrenal e do hipocampo; os níveis plasmáticos de corticoesterona e hipocampais de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). **Resultados:** Pode-se observar que os animais expostos ao LPS no período neonatal e avaliados na vida adulta apresentaram uma diminuição do consumo de sacarose; um aumento do tempo de imobilidade; redução do peso ponderal e do hipocampo; um aumento do peso da glândula adrenal e um aumento dos níveis plasmáticos de corticoesterona. O uso da imipramina não reverteu apenas a diminuição do peso do hipocampo. Quanto aos níveis hipocampais de BDNF, não houveram alterações. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que a ativação imune neonatal pode estar associada a parâmetros relacionados a depressão na vida adulta. Acredita-se que a endotoxemia pode provocar alterações fisiológicas e comportamentais, aumentando a vulnerabilidade ao desenvolvimento da depressão na vida adulta.

Palavras-chave: Endotoxemia. Depressão. Inflamação. Neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

Introduction: The pathophysiology of depressive disorders still remains misunderstood. Despite the all the contributions of the monoaminergic hypothesis, several studies have evidenced the role of neuroinflammation into the development of depression. A neuroinflammation can modulate permanent or encephalic development, the immune and endocrine regulation as well as neural circuits, which can result in physiological and behavioral changes. **Objective:** To verify an association between a neonatal immune activation and parameters related to depression in the adult life using an animal as model. **Methods:** C57BL/6 animals with two days old were exposed to LPS or PBS. When the animals completed 46 days old, it received PBS or Imipramine for 14 days. At the end of 60th day of their lives, it were evaluated the consumption of sucrose; the time of immobility; the weight of the adrenal gland and the hippocampus; levels of plasma corticosterone and hippocampal BDNF. **Results:** It shows that the animals exposed to LPS in the neonatal period and evaluated in adult life showed a decrease in the consumption of sucrose; an increase in immobility time; reduction of hippocampus weight; an increase in the weight of the adrenal gland and an increase in plasma levels of corticosteroids. The use of imipramine only did not reverse the decrease hippocampal weight. Regarding hippocampal BDNF levels, there were no changes. **In conclusion,** these results suggest that neonatal immune activation may be associated with depression-like parameters in adult life. It is believed that endotoxemia can trigger physiological and behavioral, increasing vulnerability to the development of depression in adult life.

Key words: Endotoxemia. Depression, Inflammation. Neurodevelopment.

LISTAS

- 5-HT – 5 Hidroxitriptamina ou serotonina
- ACTH – Hormônio adrenocorticotrofina
- ANOVA – Análise de variância
- AVP – Vasopressina
- BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BH4 – Tetrahidrobiopterina
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CLP – Ligação e perfuração cecal
- CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- COX-2 – Ciclo-oxigenase -2
- CRH – Hormônio liberador de corticotrofina
- DBCA – Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica
- GR – Receptores glicocorticoides
- HPA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
- IDO – Indolamina 2,3 dioxigenase
- IFN – Interferon
- IL- Interleucina
- LANEX – Laboratório de Neurociências Experimental
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
- mBDNF – BDNF maduro
- mGluR – Receptores de glutamato
- MIA – Morte indolor assistida
- MiRNA – MicroRNA
- MR – Receptores mineralocorticoides
- mRNA – RNA mensageiro
- NK – Natural killer
- NMDA – N-metil D-aspartato
- NO – Óxido nítrico

- OMS – Organização Mundial de Saúde
- OPCs – Células progenitoras oligodendrócitas tardias
- PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos
- PBS – Tampão fosfato salina
- PGE2 – Prostaglandina 2
- PPGCS – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
- proBDNF – Precursor BDNF
- SERT – Poliformismo 5-HTTLPR
- SLC6A4 – Gene transportador de serotonina
- SNC - Sistema nervoso central
- SNP – Sistema nervoso periférico
- TGF – Fator de crescimento transformador
- TLR - Toll-like
- TNF α - Fator de necrose tumoral
- TPA – Sistema ativador plasminogênio do tecido
- UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
- UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo.....	28
-------------------------------------	----

Lista de figuras

Figura 1 – Delineamento do estudo.....	26
Figura 2 – Determinação da concentração ideal de sacarose.....	30
Figura 3 – Teste de anedonia através da preferência do consumo de sacarose.....	31
Figura 4 – Imobilidade através do teste de natação forçada.....	32
Figura 5 – Avaliação do peso ponderal.....	32
Figura 6 – Avaliação do peso da glândula adrenal.....	33
Figura 7 – Avaliação do peso do hipocampo.....	34
Figura 8 – Avaliação dos níveis plasmáticos de corticoesterona.....	34
Figura 9 – Avaliação dos níveis de BDNF em tecido hipocampal.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	11
1.1.1 Depressão.....	11
1.1.2 O papel da neuroinflamação no processo da depressão.....	13
1.1.3 Envolvimento das Neurotrofinas na depressão.....	16
1.1.4 Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal e a Neuroinflamação.....	18
1.1.5 Ativação imune neonatal, neuroinflamação e transtornos psiquiátricos..	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. MÉTODOS	24
3.1 TIPO DE ESTUDO	24
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	24
3.3 ANIMAIS	24
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	25
3.5 ENSAIOS, TESTES E TÉCNICAS.....	26
3.5.1 Teste de natação forçada.....	26
3.5.2 Preferência por solução de sacarose.....	27
3.5.3 Avaliação do peso ponderal.....	27
3.5.4 Avaliação dos níveis de corticoesterona.....	27
3.5.5 Avaliação do peso do hipocampo e da glândula adrenal.....	28
3.5.6 Avaliação dos níveis de BDNF hipocampais.....	28
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO	28
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE DADOS.....	29
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1 DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE.....	30
4.2 AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA POR SACAROSE.....	30
4.3. AVALIAÇÃO DA IMOBILIDADE PELO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	31
4.4 AVALIAÇÃO DO PESO PONDERAL.....	32
4.5 AVALIAÇÃO DO PESO DA GLÂNDULA ADRENAL.....	33

4.6 AVALIAÇÃO DO PESO DO HIPOCAMPO.....	33
4.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOESTERONA.....	34
4.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF EM TECIDO HIPOCAMPAL.....	35
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	42
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO	54
ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética.....	54

1. INTRODUÇÃO

A depressão é um transtorno psiquiátrico que afeta 322 milhões de pessoas em todo o mundo e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é considerada o transtorno mais incapacitante, representando atualmente 76,4 milhões de anos perdidos. De acordo com o relatório da OMS publicado em 2017, o número de casos de depressão aumentou 18% entre 2005 e 2015. No Brasil, a depressão atinge 11,5 milhões de pessoas¹. Até 2030 deverá ser a causa principal de carga global de doença, atingindo 6,2% da população mundial².

É compreendida como uma doença heterogênea e suas causas são resultantes de uma complexa interação de processos biológicos, psicológicos, ambientais e genéticos³. A fisiopatologia da depressão, por mais de três décadas, tem sido explicada por meio da hipótese monoaminérgica e seus desdobramentos. Entretanto, esta hipótese apresenta algumas deficiências como refratariedade de 30% ao tratamento com antidepressivos⁴, taxa de recaída de até 50% após o primeiro episódio, latência de 14 dias no efeito antidepressivo e um terço dos casos não apresentam remissão completa dos sinais e sintomas⁵. Desta forma, as pesquisas atuais têm apresentado outras hipóteses, dentre elas a participação do sistema endócrino e imunológico⁶.

Estudos têm mostrado um aumento da resposta inflamatória durante o curso da depressão evidenciado por um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes^{7,8}. A hipótese citocinérgica sugere que a vulnerabilidade genética⁹; doenças como câncer e diabetes^{10,11}; doenças auto-imunes¹²; eventos de vida estressantes¹³ e infecções virais, bacterianas e parasitárias¹⁴, poderiam estar relacionadas ao desencadeamento dos transtornos depressivos através da ativação imune sistêmica. Um estudo mostra que sujeitos com diagnóstico de depressão apresentaram aumento de leucócitos sanguíneos periféricos, elevação na concentração plasmática de proteínas de fase aguda, diminuição na resposta celular a mitógenos, redução do número de linfócitos e da atividade de células *natural killer* (NK)¹⁵, alteração na expressão de antígenos e aumento nos níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias e seus receptores¹⁶. Dessa forma, sugere-se que o aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias e um desequilíbrio na resposta dos linfócitos Th1 e Th2 poderiam desempenhar um papel

relevante na fisiopatologia da depressão⁶ resultando nos sinais e sintomas em sujeitos e um comportamento de doença em modelos animais^{17,18,19}. Mesmo sendo liberadas periféricamente, as citocinas pró-inflamatórias podem adentrar e agir no encéfalo²⁰, alterando o metabolismo dos neurotransmissores, a função neuroendócrina através da hiperativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), a plasticidade neuronal com a diminuição das neurotrofinas e uma maior ativação das vias glutamatérgicas, influenciando nos comportamentos sinápticos²¹.

Neste contexto, estudos têm evidenciado a relação entre a neuroinflamação e os sintomas relacionados a depressão em diferentes idades^{22,23,24}. Contudo, pesquisas ainda têm sido realizadas no intuito de avaliar as consequências da neuroinflamação no período neonatal e os transtornos psiquiátricos na vida adulta. O encéfalo em desenvolvimento é extremamente sensível a sinais exógenos e endógenos como o estresse oxidativo e a apoptose neuronal, bem como apresenta imaturidade dos oligodendrócitos e vulnerabilidade às alterações epigenéticas²⁵, podendo sofrer alterações significativas na trajetória e desenvolvimento das células, circuitos neurais e comportamentais. Considerando também que o sistema nervoso, endócrino e imunológico estão intrinsecamente ligados e se retroalimentam, sugere-se que a neuroinflamação no período neonatal pode gerar alterações no desenvolvimento encefálico, na regulação imune, na reatividade ao estresse e consequentemente na susceptibilidade a transtornos psiquiátricos, inclusive a longo prazo^{26,27,28}.

Sendo assim, o diagnóstico e tratamento adequados aos insultos inflamatórios nas fases iniciais da vida, bem como a prevenção a doenças infecciosas e inflamatórias e do estresse precoce são fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da saúde mental dos indivíduos em todas as fases da vida. Evidências da relação entre a ativação imune neonatal e parâmetros relacionados a depressão na vida adulta podem abrir possibilidades de novos estudos sobre os mecanismos subjacentes que sustentam esses parâmetros alterados e assim contribuir para ampliação de estratégias terapêuticas e preventivas dessa doença tão devastadora que é a depressão e também de outros transtornos psiquiátricos.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Depressão

A depressão é um transtorno psiquiátrico onde há um predomínio de alterações de humor, sintomas vegetativos e cognitivos que podem perdurar por semanas a meses⁶. Os sinais e sintomas da depressão incluem humor deprimido, anedonia, alterações psicomotoras, do apetite, distúrbios do sono, fadiga, diminuição da concentração, sentimentos de inutilidade, de culpa e pensamentos relacionados à morte²⁹. Os critérios diagnósticos incluem cinco (ou mais) dos sintomas citados durante o mesmo período de duas semanas e devem representar mudança em relação ao funcionamento anterior do indivíduo. Pelo menos um dos sintomas deve ser: humor deprimido ou perda de prazer e interesse²⁹.

Segundo a OMS, a depressão é um transtorno debilitante e considerada a mais incapacitante no mundo¹. No início de 2017, um novo relatório da OMS foi publicado demonstrando que o número de casos aumentou 18% entre 2005 e 2015: são 322 milhões de pessoas em todo o mundo sendo a maioria mulheres. No Brasil, a depressão atinge 11,5 milhões de pessoas (5,8% da população)¹.

A depressão é um grave problema de saúde pública, pois é um transtorno mental de curso crônico e recorrente, que se manifesta principalmente em adultos jovens e está associada à significativa morbimortalidade. Até 2030, deverá ser a causa principal de carga global de doença (6,2%)². Portanto, a depressão tem um efeito negativo significativo sobre as relações sociais, o trabalho e a qualidade de vida, além de causar um custo elevado para a sociedade, tanto em dias perdidos de trabalho, quanto em custo direto aos sistemas de saúde². Está associada a uma ampla gama de alterações em diferentes sistemas: emocional, cognitivo, psicomotor, neurovegetativo, neuroendócrino e neuroquímico. Dessa forma, o quadro clínico da depressão parece resultar da complexa interação de processos biológicos (resposta ao estresse, fatores neurotróficos), psicológicos (personalidade e relacionamentos pessoais), ambientais (dieta, álcool, ritmos biológicos) e genéticos³.

Características fisiopatológicas consideradas na depressão incluem, além da depleção de monoaminas, a exposição crônica a níveis elevados de citocinas inflamatórias, a resistência aumentada dos receptores de glicocorticóides, ao excesso

de atividade glutamatérgica, a diminuição na síntese de neurotrofinas, a elevação dos níveis séricos de cortisol e a hiperativação do eixo HPA²². A depressão tem sido explicada há mais de três décadas por meio da hipótese monoaminérgica, propondo que a mesma seria consequência de uma menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e dopamina³⁰. O conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos, que se baseia principalmente no aumento da disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica, seja pela inibição de suas recaptações ou pela inibição da enzima responsável por suas degradações, reforça tal proposição³¹.

Muitos sintomas da depressão estão relacionados com o humor. Dessa forma, postula-se que o humor deprimido esteja associado à atividade disfuncional da amígdala e do córtex pré-frontal ventromedial, ambos innervados por projeções serotoninérgicas, dopaminérgicas e noradrenérgicas de núcleos do tronco encefálico (núcleos da rafe, substância negra e *locus ceruleus*/sistema tegmentar lateral, respectivamente)⁵.

O processamento disfuncional de informações em regiões encefálicas que recebem projeções serotoninérgicas associa-se a sintomas de depressão como: distúrbios do sono (por um processamento ineficiente das informações no hipotálamo, no tálamo, no prosencéfalo basal e difusamente no córtex pré-frontal), alterações do peso e/ou apetite (relacionadas ao controle serotoninérgico do hipotálamo), a ideação suicida (relacionada a um processamento disfuncional em regiões como amígdala, córtex pré-frontal ventromedial e orbital frontal), e sentimentos de culpa ou menos valia (associados a um processamento ineficiente de informações também no córtex pré-frontal ventromedial e amígdala)³². A dopamina está associada aos sintomas neuropsicomotores da depressão, como a fadiga, avolição e lentificação motora³³. Já a noradrenalina está associada com a regulação do humor, estado de vigília, cognição e outras funções³².

A teoria monoaminérgica, porém, apresenta algumas lacunas como a refratariedade de 30% ao tratamento com antidepressivos, taxa de recaída de até 50% após o primeiro episódio e latência de 14 dias no efeito antidepressivo. Além do mais, apenas um terço dos casos apresentam remissão completa dos sinais e sintomas⁵. Sendo assim, estudos clínicos e pré-clínicos questionam essa visão da depressão^{34,35},

propondo além da teoria monoaminérgica a participação dos sistemas imunológico e endócrino na sua etiologia.

1.1.2 O papel da neuroinflamação no processo da depressão

Estudos mostram que há uma ativação das respostas imunoinflamatórias na depressão⁴, onde pacientes exibem um aumento no número de leucócitos periféricos; elevação na concentração plasmática de proteínas de fase aguda (como a proteína C reativa); diminuição na resposta celular a mitógenos; redução do número de linfócitos e da atividade de células NK; alteração na expressão de antígenos; e um aumento nos níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias tais como a interleucina 6 (IL-6), IL-1, IL-2 e o fator de necrose tumoral tipo α (TNF- α)^{36,37}.

As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que participam da comunicação entre as células do sistema imunológico, nervoso e endócrino³⁸. Elas ativam ou inibem células imunes e atuam sobre os receptores de membrana celular como neurotransmissores ou receptores intracelulares para transmitir informações para as células⁴. São secretadas principalmente a partir de monócitos, macrófagos ou linfócitos, assim como no encéfalo por neurônios, células endoteliais, astrócitos e micróglia e atuam como neuromoduladores, mediando aspectos neuroquímicos, neuroendócrinos e comportamentais²².

Foram identificadas muitas famílias de citocinas como o TNF- α , os interferons (IFN), as IL-1 a 26, os fatores de crescimento transformador (TGF), entre outros³⁹. As citocinas pró-inflamatórias ativam a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), aumentam os níveis de prostaglandina E2 (PGE2), ativam as células inflamatórias e induzem as reações inflamatórias³⁸. As citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ estão implicadas no desenvolvimento neuronal, na plasticidade, na sinaptogênese, no reparo tecidual, além de promoverem necrose neuronal após lesões cerebrais traumáticas⁷. Durante a inflamação crônica, usualmente, os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas e as citocinas anti-inflamatórias estão diminuídas. As consequências desta desregulação podem estar associadas aos transtornos psiquiátricos, incluindo os transtornos de humor, de ansiedade e a esquizofrenia^{40,41}.

O papel das citocinas na depressão foi proposto pela primeira vez por Smith (1991)⁴² sob a forma da “teoria dos macrófagos na depressão” e posteriormente

estudada por Maes (1995)⁴³, com base na observação de pacientes com diagnóstico de depressão clínica grave. Estes pacientes apresentavam aumento das concentrações sanguíneas de biomarcadores inflamatórios (ex.: citocinas pró-inflamatórias IL-1; IL-6, TNF- α), propondo assim que a depressão poderia estar associada a uma resposta de fase aguda, ou seja, a um aumento na atividade inflamatória local ou sistêmica⁴⁴.

Maes e colaboradores descreveram que a IL-6 estava aumentada no soro de pacientes deprimidos e observaram também que 45% dos doentes tratados terapêuticamente com IFN- α desenvolveram sintomas depressivos que terminaram quando essas citocinas foram retiradas⁴³. Um outro estudo mostrou que a exposição a longo prazo à terapia com IFN- α para tratamento de doenças infecciosas ou câncer conduziu entre 20% a 50% dos pacientes a desenvolver depressão clinicamente significativa⁴. Duman e colaboradores (2016) demonstraram, em um estudo clínico, que a inibição de TNF- α em pacientes com psoríase reduziu os sintomas depressivos⁴⁵. Em um outro estudo, Raison e colaboradores (2013) demonstraram que somente pacientes com proteína C reativa elevada, um biomarcador de inflamação, apresentaram uma resposta antidepressiva ao infliximab, um antagonista de TNF- α ⁴⁶.

Em modelos animais, a desregulação no balanço citocinérgico induz a síndrome do comportamento de doença, que é caracterizado por alterações no sono, apetite, atividade, humor, energia e sociabilização⁴⁷. Comim e colaboradores (2010) mostraram que após 14 dias da indução de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP), os animais apresentaram parâmetros relacionados a depressão caracterizados pelo comportamento anedônico, aumento dos níveis de corticoesterona e do hormônio adrenocorticotrófico, aumento do volume da glândula adrenal, diminuição do volume do hipocampo e uma diminuição dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)²³.

Neste contexto, a hipótese citocinérgica sugere que a vulnerabilidade genética⁹, doenças médicas (como câncer, diabetes)^{10,11}, doenças auto-imunes¹², eventos de vida estressantes¹³, infecções virais, bacterianas e parasitárias¹⁴, podem estar relacionados ao desencadeamento da depressão através da ativação imune.

Há receptores de citocinas localizados no sistema imunológico periférico e em vários tecidos do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP)⁴⁴.

As citocinas produzidas no sistema imune periférico podem adentrar o encéfalo por diferentes vias: a humoral, que envolve a passagem através de regiões onde a barreira hematoencefálica está menos restritiva ou comprometida; a neural, que envolve a ligação de citocinas a fibras nervosas aferentes periféricas, como o nervo vago, estimulando fibras catecolaminérgicas ascendentes no cérebro ou sendo traduzidas de volta para sinais centrais de citocinas⁴; e a celular, que envolve o tráfico de células imunes ativadas pela vasculatura encefálica⁴⁸.

No encéfalo, células neuronais e microgliais serão sensibilizadas e expressarão citocinas pro-inflamatórias⁷, iniciando o processo neuroinflamatório. Estruturas do SNC que são afetadas pelas citocinas incluem o *locus ceruleus*, o hipocampo, o córtex pré-frontal e o hipotálamo. Estas estruturas estão associadas a processos biológicos que fundamentam as alterações psicológicas⁴⁹.

As citocinas inflamatórias podem interagir com múltiplos caminhos envolvidos no desenvolvimento da depressão, incluindo o metabolismo das monoaminas, a plasticidade sináptica, os neurocircuitos relevantes para a regulação do humor, a função neuroendócrina, transcrição de genes e tradução e mudanças epigenéticas que podem contribuir para desequilíbrios a curto e a longo prazo das funções neuroquímicas e do comportamento neuronal^{45,50}.

As citocinas afetam o metabolismo das monoaminas por diferentes mecanismos, sendo um deles pela capacidade de reduzir a disponibilidade de triptofano para a síntese de serotonina, através da sua implicação na estimulação de aminoácidos que competem com o triptofano pela recaptação⁵¹. Um outro mecanismo proposto é o de que essas citocinas reduziram a quantidade do triptofano disponível via ativação da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO)⁵². Tal enzima converte o triptofano em quinurenina e ácido quinolínico, este último uma substância neurotóxica implicada em transtornos neurodegenerativos e cuja via resulta na produção de metabólitos neurotóxicos presentes em indivíduos deprimidos²⁷. O ácido quinolínico é também um agonista de receptores N-metil D-aspartato (NMDA) que prejudica o *feedback* negativo dos glicocorticóides e causa atrofia hipocampal e perda de receptores de glicocorticóides¹⁵. Dessa forma, em indivíduos deprimidos, haveria um aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, levando à ativação da enzima IDO com consequente redução na disponibilidade de serotonina e um aumento na liberação de glutamato no estriado e no córtex⁵³.

Outra via que pode influenciar o metabolismo da monoamina é a via de sinalização de citocinas proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK p38), podendo aumentar a expressão e a função do polimorfismo 5-HTTLPR (SERT), região promotora do gene SLC6A4 transportador da serotonina^{54,55}, e também influenciar o transportador de dopamina⁵⁶. As citocinas inflamatórias podem influenciar também a síntese de neurotransmissores através da interrupção da tetrahydrobiopterina (BH4), que é um co-fator de enzima essencial para a hidroxilase de triptofano e a tirosina hidroxilase, que são as enzimas limitantes da taxa para a síntese de serotonina, dopamina e norepinefrina, respectivamente^{37,50}.

Além das monoaminas, o glutamato desempenha um papel crucial nos processos patológicos associados à depressão⁵⁷. O óxido nítrico (NO), um mediador inflamatório, aumenta a liberação de glutamato e diminui a expressão de transportadores de glutamato em astrócitos e oligodendrócitos, diminuindo assim a recaptação do glutamato aumentando a concentração inter-sináptica⁵⁸. A estimulação do receptor de glutamato NMDA extra-sináptico não só causa danos excitotóxicos aos neurônios e astrócitos mas também resulta em uma diminuição na síntese de BDNF, um fator neurotrófico chave que governa a reparação neuronal⁵⁹.

1.1.3 Envolvimento das Neurotrofinas na depressão

As concentrações elevadas e a ativação prolongada das citocinas inflamatórias no SNC e SNP podem resultar em uma diminuição dos níveis e da síntese de neurotrofinas, conduzindo à redução da reparação neuronal, diminuição da neurogênese e maior ativação da via glutamatérgica que contribui para a apoptose neuronal, o estresse oxidativo e a indução de apoptose em astrócitos e oligodendrócitos⁶⁰.

O BDNF é uma importante proteína membro da família das neurotrofinas e está presente em abundância no tecido encefálico e periférico. Pode ser encontrada em neurônios e plaquetas, sendo capaz de cruzar a barreira hematoencefálica³⁵. As neurotrofinas regulam a diferenciação e a sobrevivência de neurônios, modulando a plasticidade e a transmissão sináptica e inibindo a morte celular⁶¹. Um estudo realizado em tecido *pos-mortem* revelou que a diminuição dos níveis de BDNF foi associada a perda celular e progressiva redução do volume do hipocampo e de

estruturas límbicas, provocando alterações no sistema de memórias bem como transtornos psiquiátricos, dentre eles a depressão⁶².

O estresse está altamente associado à diminuição dos níveis de BDNF no encéfalo, evidenciado através de estudos em modelos animais de depressão, onde o estresse crônico prejudicou a expressão de BDNF no hipocampo, produzindo alterações morfológicas nessa região⁶³. Um recente estudo de revisão evidenciou que o estresse vivido no período neonatal pode estar associado a alterações dos receptores de glutamato (mGluR1, mGluR5) e RNA mensageiro (mRNA) de BDNF e, que estas alterações, podem contribuir no comportamento sintomático da depressão e ansiedade. Ainda sugere que um aumento dos níveis de glicocorticóides está associado à regulação negativa do BDNF durante a fisiopatologia da depressão⁶⁸.

O estresse aumenta os níveis de cortisol supra renal no plasma, sendo que estudos apresentaram uma correlação inversa entre os níveis de estresse/cortisol e expressão BDNF no hipocampo, uma vez que os receptores de glicocorticóides (GR NR3C1) e de mineralocorticoide (MR NR3C2) são altamente expressos no hipocampo, agindo em equilíbrio para regular alguns processos fisiológicos e neurológicos, como respostas ao estresse e a sobrevivência neuronal^{64,65}. Alterações na via do BDNF estão associadas com estresse na infância e a sintomas de depressão na vida adulta, especialmente devido à reprogramação de algumas vias de genes sensíveis ao estresse⁶⁶. O gene do BDNF tem sido associado também à reatividade cognitiva para o humor deprimido⁶⁷.

O BDNF possui papel central na patogênese da depressão através do sistema ativador plasminogênio do tecido (tPA)/plasmina que é crucial no processamento da clivagem do precursor do BDNF (proBDNF) em BDNF maduro (mBDNF). Um estudo demonstrou que no início do tratamento, pacientes com diagnóstico de depressão apresentaram uma diminuição dos níveis de tPA sérico, BDNF e a proporção de BDNF/proBDNF significativamente menores do que os controles. Após 8 semanas de tratamento com escitalopram ou duloxetina as alterações em tPA, BDNF, proBDNF e a relação BDNF/proBDNF foram revertidas⁶⁸.

A interrupção da sinalização do BDNF na depressão e nos processos de restauração induzidos pelo tratamento com antidepressivos se direcionam principalmente para o sistema da serotonina (5-HT) que é outro fator principal no desenvolvimento e neuroplasticidade do encéfalo⁶⁹. O BDNF e a 5-HT possuem uma

relação estreita na neuroplasticidade, como demonstrado em um estudo de cultura de células do núcleo da rafe de um embrião de camundongo de 14 dias de idade em que a exposição de 18h ao BDNF quase duplicou o número de neurônios 5-HT e o crescimento axonal⁷⁰. Dessa forma, esses estudos reforçam a hipótese de que a diminuição da expressão do BDNF e, possivelmente, outros fatores de crescimento estão associados com a depressão. Além disso, a regulação positiva de BDNF desempenha um papel nas ações do tratamento antidepressivo, revertendo a atrofia e a perda celular^{51,60}.

1.1.4 Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal e a Neuroinflamação

As citocinas pró-inflamatórias possuem capacidade de provocar a hiperativação do eixo HPA e exerce um papel fundamental na resposta aos estímulos externos e internos e na patogênese da depressão⁷¹. A atividade do eixo HPA é modulada pela secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, os quais, por sua vez, ativam a secreção do hormônio adrenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise que, finalmente, estimula a secreção de cortisol pelo córtex adrenal⁷². Estes hormônios possuem acesso fácil ao encéfalo, onde se ligam aos receptores MR expressos predominantemente no hipocampo, amígdala central e a receptores GR altamente expressos na maioria das regiões encefálicas, para exercerem ações genômicas e não genômicas⁷³. O estresse crônico nas fases iniciais do desenvolvimento encefálico pode induzir mudanças persistentes na capacidade do eixo HPA de responder ao estresse⁷⁴ e esse mecanismo pode levar a um aumento na susceptibilidade à depressão^{75,76}. Os receptores GR são inibidos pela ação das citocinas inflamatórias sendo capazes de mediar a resistência a glicocorticóides⁷⁷ e impedi-los de exercerem sua ação anti-inflamatória⁷⁸.

Juruena e colaboradores (2004) descreveram alguns estudos onde um percentual significativo de pacientes com diagnóstico de depressão apresentaram concentrações aumentadas de cortisol no plasma, na urina e no fluido cerebrospinal; resposta exagerada de cortisol após estimulação com hormônio ACTH e aumento do volume tanto da hipófise como das glândulas adrenais, sugerindo a hiperativação do eixo HPA⁷⁹. Também foi demonstrada uma correlação significativa entre concentrações de cortisol pós tratamento com dexametasona e a produção de IL-

1 β ⁸⁰. Em outro estudo, foi demonstrado correlação significativa entre o aumento das concentrações sanguíneas de TNF- α e a redução da sensibilidade cutânea à administração tópica de glicocorticóide em pacientes deprimidos⁸¹.

A hipersecreção de glicocorticóides e de citocinas pró-inflamatórias leva a um prejuízo na neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica encefálica, refletido em alguns dos sintomas da depressão⁷². A expressão dos receptores 5-HT encontra-se sob influência da inibição tônica dos esteróides adrenais no hipocampo, enquanto a expressão de receptores 5-HT encontra-se aumentada em situações de estresse crônico⁷². Sendo assim, uma elevação prolongada dos níveis de glicocorticóides, como acontece no estresse crônico e na depressão, levaria à dessensibilização de seus receptores centrais e, provavelmente, dos macrófagos, o que poderia justificar as diversas alterações imunes já descritas em quadros depressivos⁴. Paralelamente, a exposição prolongada aos hormônios glicocorticóides também seria capaz de reduzir os níveis de noradrenalina no *locus coeruleus*, correlacionando, dessa forma, o processo inflamatório, o estresse e a depressão⁶.

1.1.5 Ativação imune neonatal, neuroinflamação e transtornos psiquiátricos

A ativação imune ocorre através de um processo infeccioso, causado por agentes patogênicos, como bactérias (gram-positivas ou gram-negativas) e fungos⁸², assim como através de endotoxinas (ou mediadores inflamatórios) como o LPS⁸³.

O LPS, que compreende glicolipídeos da membrana externa das bactérias gram-negativas, tem sido utilizado como um modelo clássico para a ativação das células imunológicas atuando como molécula de alarme, ou seja, sua presença na circulação provoca uma intensa resposta inflamatória sistêmica. A resposta do hospedeiro à endotoxina é responsável pelas propriedades potencialmente letais da endotoxina^{84,85}. Os efeitos patofisiológicos das bactérias gram-negativas são similares aos da endotoxina bacteriana e a endotoxemia experimental é um modelo reconhecido para o estudo de ativação imune por gram-negativos⁸³.

A ativação imune através do LPS induz uma inflamação sistêmica⁸⁶ através da ativação do sistema imune inato com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 e outros mediadores inflamatórios, juntamente com padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), iniciando uma cascata de

alterações fisiológicas e comportamentais⁴⁷. Os receptores de reconhecimento desempenham um papel crítico na ligação a alvos microbianos na inflamação¹⁵. O mais importante sistema desses receptores são a família de receptores *Toll-like* (TLR)⁸⁷. Os TLR são receptores transmembrana que detectam endotoxina e numerosos mediadores microbianos diferentes, incluindo componentes bacterianos, fúngicos, virais e parasíticos. A ativação do sistema imune inato e seus componentes celulares como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células NK são os principais responsáveis pela inflamação sistêmica²⁶.

A inflamação sistêmica pode induzir um quadro de neuroinflamação, associado a danos ou disfunções encefálicas, devido a um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica. O aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica é ocasionado, em grande parte, pelo aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias sistêmicas que a atravessam e acessam o tecido encefálico^{88,89,90}. As concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo são responsáveis por ativar a microglia, liberando concentrações ainda maiores de mediadores pró-inflamatórios potencialmente tóxicos, causando danos reversíveis e irreversíveis⁹¹ no encéfalo em desenvolvimento. O tecido encefálico em desenvolvimento apresenta uma sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo, o que pode estar relacionado ao aumento de células apoptóticas²⁵, a imaturidade dos oligodendrócitos e os processos neuroinflamatórios. Todas estas alterações podem ter consequências neuroquímicas e comportamentais a longo prazo.

Uma vez que a neuroinflamação é estabelecida, o SNC é severamente comprometido, principalmente no encéfalo imaturo^{92,93}. Embora o cérebro atinja aproximadamente 90% de seu tamanho adulto até os seis anos de idade, os subcomponentes da matéria cinzenta e branca continuam sofrendo mudanças dinâmicas ao longo da vida⁹⁴. Estudos mostram uma perda na densidade cortical de substância cinzenta ao longo do tempo⁹⁵. A perda de matéria cinzenta cortical ocorre primeiro em áreas sensoriais primárias, seguidas do córtex temporal e pré-frontal indicando que o córtex pré-frontal é uma das últimas regiões do cérebro a amadurecer. As regiões subcorticais possuem algumas das maiores mudanças durante o desenvolvimento no cérebro, particularmente nos gânglios da base. As mudanças no volume estrutural dos gânglios da base e regiões pré-frontais através da poda sináptica normal, eliminando a abundância de sinapses, permitem o ajuste e

fortalecimento das conexões relevantes entre as regiões pré-frontais e subcorticais relacionadas à processos cognitivos⁹⁶. Em contraste com a matéria cinzenta, o volume de matéria branca aumenta em um padrão linear ao longo do desenvolvimento e na idade adulta, provavelmente refletindo a mielinização contínua de axônios por oligodendrócitos, aumentando a condução neuronal e a comunicação⁹⁴. Além desses fatores, o cérebro em desenvolvimento apresenta maior número de mastócitos do que no cérebro adulto, e quando ativados, contribuem para lesões excitotóxicas, descrito em um estudo com camundongos neonatais, exacerbando a toxicidade do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF – β 1)⁹⁷.

Em um estudo pré-clínico de inflamação sistêmica induzida por injeções intraperitoneais diárias de IL-1 β durante os primeiros cinco dias de vida, o número de axônios não mielinizados foi aumentado e o número de fibras mielinizadas foi diminuída⁹⁸. Insultos nessa fase do desenvolvimento podem induzir alterações epigenéticas, incluindo a regulação enzimática da transcrição através da modificação de *tags* permissivas (Ex.: acetilação, metilação) em histonas ou a regulação da tradução mediada por microRNA (miRNA). Alterações nas marcas epigenéticas e na expressão de miRNAs podem ter papéis fundamentais nas consequências a longo prazo de insultos encefálicos perinatais, tais como a incapacidade das células progenitoras oligodendrócitos tardias (OPCs) de amadurecer e diferenciar-se adequadamente⁹⁷.

Estudos realizados em modelos animais com injeções repetidas de LPS durante a primeira semana pós-natal apontaram que a inflamação sistêmica sustentada interfere na maturação do SNC, causando atrofia neuronal, atraso de mielinização, gliose reativa aguda, lesão da substância branca e paralisia cerebral^{99,100,101}. Eventos durante o período neonatal e infantil que ocasionem um aumento do estresse e da liberação de glicocorticóides e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 beta, TNF- α , INF- α , IL-6 e proteína C reativa podem estar associados a maior vulnerabilidade ou a pré-disposição ao desenvolvimento de episódios depressivos durante a vida adulta¹⁰².

Nos últimos anos, vários autores discutiram a participação das doenças infecciosas em neonatos no risco para transtornos psiquiátricos. Kraepelin considerou que “infecções nos anos de desenvolvimento pode ter uma casual importância” para a esquizofrenia¹⁰³. Crianças internadas por uma infecção bacteriana no SNC entre as

idades de 2 e 5 anos estavam quatro vezes em maior risco de hospitalização mais tarde para transtornos psiquiátricos como depressão e esquizofrenia¹⁰⁴. Menninger em uma revisão de estudos sobre as doenças infecciosas e doenças psiquiátricas, relatou que os casos de meningite aguda, encefalite, febre tifóide, febre recorrente, tifo, gripe, malária, tuberculose, infecções gastrointestinais e septicemia foram frequentemente seguidos por um agudo episódio psiquiátrico transitório¹⁰⁵. Rantakallio e colaboradores, em um estudo comparando indivíduos com infecção no SNC durante a infância com um grupo controle acompanhados até 27 anos de idade, encontrou um aumento no número de diagnóstico de esquizofrenia no grupo infecção¹⁰⁶.

Na última década os estudos têm proporcionado detalhes sobre a associação entre ativação imune neonatal e eventos neurológicos e cognitivos a longo prazo bem como doenças neurodegenerativas^{102,107}. Dados de pesquisas suportam a ideia de que a ativação imunológica neonatal aumenta indiretamente o risco de *déficits* cognitivos, por meio da programação a longo prazo de respostas neuroimunes que posteriormente interferem nos processos celulares de aprendizagem e memória^{108,109}. Lan e colaboradores (2015) demonstraram que a injeção intracerebral de LPS em camundongos neonatais resultou em lesão neuronal dopaminérgica e *déficits* comportamentais na vida adulta, sugerindo que tal exposição pode desencadear uma resposta neuroinflamatória crônica, por ativação microglial persistente e expressão elevada de IL - 1 β na substância negra de camundongos adultos¹¹⁰.

Comim e colaboradores (2010) mostraram que uma única injeção de LPS na fase neonatal de camundongos foi capaz de alterar a memória e o aprendizado na fase adulta. Neste mesmo estudo, os autores evidenciaram um aumento do tempo de imobilidade durante o teste de natação forçada, demonstrando que os animais poderiam ter um comportamento relacionado a depressão²³. Apesar de todas as evidências descritas, a relação entre eventos vinculados a processos neuroinflamatórios durante o desenvolvimento encefálico e a presença de transtornos psiquiátricos na idade adulta ainda não estão totalmente claros.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros relacionados à depressão em animais adultos submetidos à ativação imune neonatal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o comportamento anedônico em animais adultos submetidos a ativação imune neonatal;

Avaliar o tempo de imobilidade em animais adultos submetidos a ativação imune neonatal;

Verificar as alterações do peso ponderal em animais adultos submetidos a ativação imune neonatal;

Analisar o peso da glândula adrenal em animais adultos submetidos a ativação imune neonatal;

Aferir o peso do hipocampo em animais adultos que foram submetidos à ativação imune neonatal;

Avaliar os níveis de corticoesterona no plasma de animais adultos submetidos a ativação imune neonatal

Analisar os níveis de BDNF no hipocampo em animais adultos submetidos a ativação imune neonatal.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa é do tipo pré-clínica e experimental. Foi realizada no Laboratório de Neurociências Experimental (LANEX) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), campus Pedra Branca.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Neste estudo foi utilizado Cloridrato de Imipramina (Tofranil, Novartis, Brasil); tampão fosfato salina (PBS - Laborclin, Brasil); sacarose (Merck, Brasil); balança digital (Powner, Brasil); balança de precisão (Shimadzu – AUY220, Brasil); centrífuga refrigerada (Solab Científica, Brasil); leitor de microplacas (Perlong Medical DNM-9602, China); kit ELISA para BDNF (Genese, Brasil); LPS (026:B6LE. Coli – Sigma Aldrich, Brasil); quimioluminescência (Cortisol Immulite 2000 DPC, Los Angeles, CA, EUA).

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 52 camundongos adultos C57BL/6 machos e fêmeas (20 para o grupo PBS e 32 para o grupo LPS). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno de tamanho padrão (30x 20 x 13 cm), ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00) e comida e água com acesso livre. O ambiente foi mantido a temperatura de 23 + 1°C. Os animais foram acondicionados no Biotério do LANEX. O número de animais por grupo foi calculado em $n=8$. A fórmula empregada para o cálculo foi a equação $n/\text{grupo}=2[(Z\alpha/2 + Z\beta) \times d/\Delta]^2$, para comparação de duas médias, considerando-se o poder de teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio padrão de 12,5% a partir de registros de estudos anteriores e o valor da diferença a ser detectada igual a 18%. Entende-se, portanto, que o número de pelo menos 8 animais foi utilizado em cada grupo experimental para garantir que as conclusões dos experimentos sejam válidas, dentro de um risco aceitável de não estar

observando diferenças onde elas existem, nem tão pouco estar observando diferenças onde elas não existam. Para segurança e confiabilidade dos dados, foi utilizado 10 animais por grupo neste estudo.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para este estudo utilizou-se 12 camundongos adultos C57BL/6 sendo 6 machos e 6 fêmeas, pesando entre 18 e 22g, totalizando 6 casais provindos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram acasalados (um macho para uma fêmea) e a prole foi utilizada. Ao completarem dois dias de vida, a prole foi retirada para a exposição à endotoxemia e logo em seguida retornam e foram mantidos em suas caixas-moradias até vinte e um dias após o nascimento, quando foram separados por sexo e alocados em caixas próprias, estas contendo 5 animais cada. Estes animais foram avaliados ao completarem 46 dias de vida.

A endotoxemia foi induzida com uma única administração subcutânea de 25 µg/kg de LPS. O LPS foi preparado com o auxílio de PBS para diluição. Os animais controles receberam apenas PBS no mesmo volume administrado o LPS. A mortalidade foi avaliada durante todo o experimento. A literatura relata que este modelo experimental é o que mais se assemelha a sepse neonatal, pois há mortalidade de 60% nos primeiros dias de vida¹¹¹.

Após completarem 21 dias, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: PBS+PBS; PBS+Imipramina; LPS+PBS; LPS+Imipramina. Quando completaram 46 dias de vida, os animais (PBS ou LPS) receberam PBS ou Imipramina (10 mg/kg, via intraperitoneal, uma vez por dia) durante 14 dias. O tratamento com imipramina (antidepressivo pertencente à família dos tricíclicos, classicamente utilizada para o tratamento dos transtornos depressivos) foi utilizado para validar os parâmetros relacionados à depressão, garantindo a validade preditiva que um modelo animal de depressão exige^{112,113}.

Ao completarem 60 dias de vida, os animais foram avaliados pelos seguintes parâmetros: comportamento anedônico (preferência por solução de sacarose), desamparo aprendido (tempo de imobilidade do teste de natação forçada), peso corporal, peso da glândula adrenal, níveis de corticoesterona plasmáticos (equivalente ao cortisol) e níveis de BDNF no hipocampo. O peso corporal dos animais foi avaliado

antes do teste de preferência por sacarose. Ao fim deste teste, os animais foram submetidos ao teste de natação forçada. Após, foram anestesiados e realizada a punção cardíaca para retirada do sangue. O sangue foi adicionado a um tubo contendo heparina e centrifugado. O plasma foi utilizado para dosagem dos níveis de corticoesterona. Na sequência, os animais foram submetidos à morte indolor assistida (MIA) recebendo injeção de uma dose excessiva de pentobarbital de 80 mg/kg via intraperitoneal de acordo com a resolução 1000, de 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), sob a supervisão de médico veterinário responsável. A glândula adrenal e o hipocampo foram dissecados, pesados, homogeneizado e mantido no freezer -80°C para posterior análise (Figura 1).

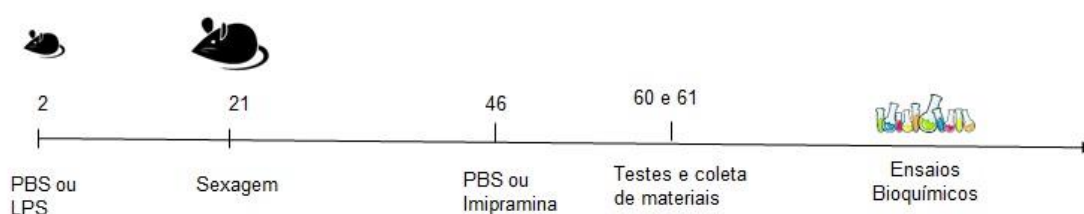


Figura 1 – Delineamento do estudo.

3.5 ENSAIOS/TESTES/TÉCNICAS

3.5.1 Teste de natação forçada

Os camundongos foram submetidos ao teste proposto por Porsolt e colaboradores (1979) para avaliação do comportamento relacionado a depressão¹¹⁴. O procedimento consistiu em colocar o animal, individualmente, em cilindros de vidro (25 cm de altura e 10 cm de diâmetro) contendo água (até 6 cm da altura do cilindro) a 21 – 23°C por um período de 7 minutos. Durante os últimos 5 minutos foi registrado o tempo total de imobilidade para cada animal, considerando como imobilidade a realização de movimentos mínimos para a manutenção da cabeça fora da água. A ausência de natação é considerada como desamparo aprendido, ou seja, o animal não tenta mais sair da situação aversiva.

3.5.2 Preferência por solução de sacarose

Foi estabelecida a melhor concentração de sacarose a ser utilizada nos testes subsequentes. As doses utilizadas foram de 0,5% a 3,0% e a partir da curva de preferência dos animais, a melhor concentração de sacarose foi estabelecida. Esta análise foi realizada com a exposição do animal à solução de sacarose durante 24 horas, sendo que não houve privação de água e comida para a realização do teste. A preferência de sacarose foi medida através da pesagem das garrafas de água e de sacarose antes do teste e após 24 horas, usando-se a diferença para o cálculo da preferência de sacarose, que é feita através da equação abaixo:

$$\% \text{ preferência de sacarose} = \frac{\text{consumo total de sacarose} \times 100}{\text{consumo total (H}_2\text{O} + \text{sacarose)}}$$

O parâmetro utilizado foi o estabelecimento da curva de preferência dos animais, e a partir disto a melhor concentração foi estabelecida.

3.5.3 Avaliação do peso ponderal

O peso corporal dos animais foi avaliado em gramas antes do teste de anedonia em uma balança de peso simples.

3.5.4 Avaliação dos níveis de corticoesterona

Os animais foram anestesiados e as amostras de sangue foram coletadas através de punção cardíaca. O sangue coletado foi depositado em microtubos (eppendorf), que foram submetidos à centrifugação a 4.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos. Para as dosagens dos níveis plasmáticos de corticoesterona, as amostras foram coletadas com anticoagulante (heparina). Após a centrifugação, o plasma foi armazenado em freezer a -80°C. Os níveis plasmáticos de corticoesterona foram mensurados por quimioluminescência para coeficiente de variação inter ensaio <10 e limite de detecção de 5µg/dL.

3.5.5 Avaliação do peso do hipocampo e da glândula adrenal

O hipocampo e a glândula adrenal foram dissecados e avaliados em gramas por uma balança de precisão.

3.5.6 Avaliação dos níveis de BDNF hipocampais

Após a MIA, o hipocampo foi homogeneizado e na sequência foi armazenado no freezer (-80°C) para posterior análise bioquímica. Os níveis de BDNF no hipocampo foram medidos por um kit ELISA sanduíche anti-BDNF, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o hipocampo foi homogeneizado em solução tampão de fosfato com 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo e 1 mM de EGTA. As placas de microtitulação de 96 poços (de fundo plano) foram revestidas durante 24 horas com as amostras diluídas 1:2 em diluente de amostra e padrão de curva que varia entre 7.8 para 500 pg/ml de BDNF. Os poços foram em seguida lavados quatro vezes com diluentes de amostra, e um anticorpo de coelho anti-BDNF monoclonal diluído a 1:1000 em diluente da amostra foi adicionado a cada poço e incubado durante 3h à temperatura ambiente. Após a lavagem, um anticorpo peroxidase anti-coelho conjugado (diluído a 1:1000) foi adicionado a cada poço e incubado à temperatura ambiente durante 1h. A quantidade de BDNF foi determinada por absorbância a 450 nm. A curva padrão demonstrou uma relação direta entre a densidade óptica e concentração de BDNF. A proteína total no hipocampo foi medida pelo método BCA, utilizando a albumina de soro bovino como um padrão.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo

VARIÁVEIS	TIPO	NATUREZA	PROPOSTA DE UTILIZAÇÃO
LPS	Independente	Qualitativa – Nominal Dicotômica	Sim / Não
Imipramina	Independente	Qualitativa – Nominal Dicotômica	Sim / Não
Consumo de sacarose	Dependente	Quantitativa – Contínua	% preferência de sacarose
Tempo de imobilidade	Dependente	Quantitativa – Contínua	Segundos
Peso corporal	Dependente	Quantitativa – Contínua	Gramas

Peso glândula adrenal	Dependente	Quantitativa – Contínua	Gramas
Peso do hipocampo	Dependente	Quantitativa – Contínua	Gramas
Níveis de Corticoesterona	Dependente	Quantitativa – Contínua	µg/dl
Níveis de BDNF	Dependente	Quantitativa – Contínua	pg/ml

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Após a coleta dos dados foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para caracterização dos dados. Os dados dos parâmetros avaliados foram considerados paramétricos e foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão da média. A análise estatística dos dados entre os grupos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando o valor de p foi significativo, comparações post hoc foram feitas pelo teste de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Este estudo foi submetido à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNISUL, seguindo os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (do inglês *Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos EUA, NIH), assim como a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica – DBCA (2016), do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado sob o nº. de protocolo 17.004.4.01.IV (Anexo A).

4. RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE

No teste para a determinação da melhor concentração de sacarose, foram oferecidas soluções em diferentes concentrações, que variaram entre 0,5% a 3,0%. A partir disso, foi estabelecida a curva de preferência de sacarose, no qual um consumo entre 50% e 70% foi considerado a melhor concentração (Figura 2).

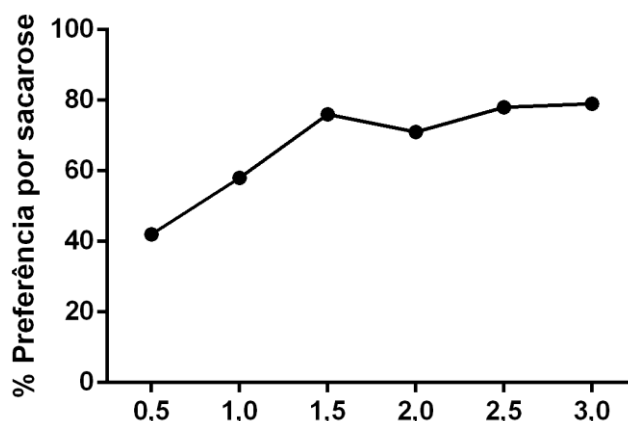


Figura 2. Determinação da concentração ideal de sacarose. Os dados foram expressos por média e desvio padrão (n=20). Concentração ideal definida por consumo preferencial de sacarose de 50-70% dos animais, ou seja, 1%.

Foi observado que a melhor concentração foi a de 1% de sacarose pois se manteve entre 50% e 70%. Esta concentração foi a utilizada na avaliação da preferência por sacarose

4.2 AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA POR SACAROSE

A preferência por sacarose foi avaliada utilizando a concentração de 1% conforme o resultado da curva de preferência demonstrada acima. (Figura 2).

Foi possível observar que os animais expostos a endotoxemia no período neonatal apresentaram uma diminuição significativa do consumo de sacarose quando comparados ao grupo de animais que receberam PBS no período neonatal ($p=0,001$). Em contrapartida, os animais expostos a endotoxemia no período neonatal e que receberam tratamento com imipramina quando adulto jovens, aumentaram significativamente o consumo de sacarose quando comparados aos animais também expostos a endotoxemia mas que não receberam tratamento com imipramina ($p=0,001$).

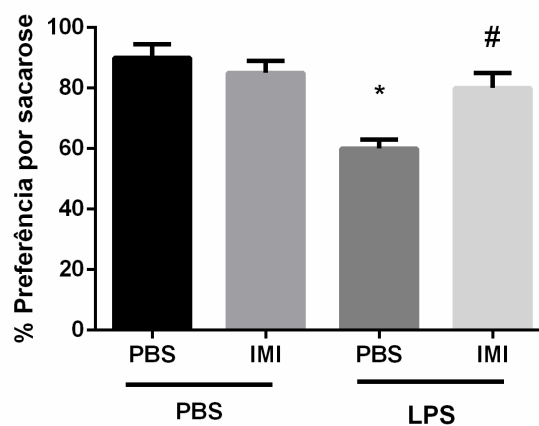


Figura 3. Teste de anedonia através da preferência do consumo de sacarose. Dados expressos em média e desvio padrão ($n=10$). * $p<0,05$ vs. PBS + PBS. # $p<0,05$ vs. LPS + PBS.

4.3. AVALIAÇÃO DA IMOBILIDADE PELO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

Pode-se observar que os animais expostos à endotoxemia no período neonatal apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparados aos animais que receberam PBS ($p<0,0001$). Com o uso da imipramina, os animais expostos a endotoxemia no período neonatal reduziram significativamente o tempo de imobilidade quando comparados aos animais que também foram expostos a endotoxemia mas não receberam imipramina ($p<0,001$).

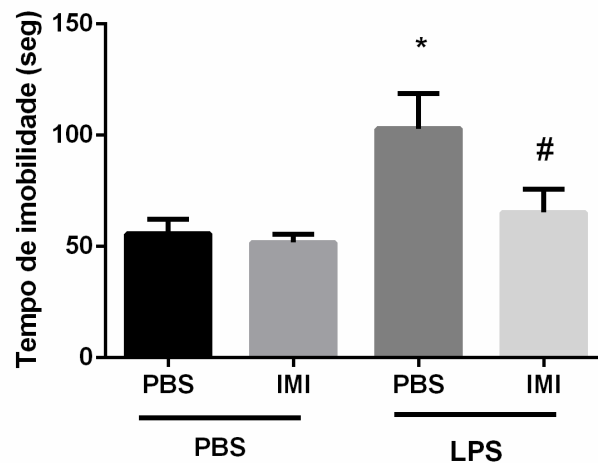


Figura 4. Imobilidade através do teste de natação forçada. Dados expressos em média e desvio padrão (n=10). *p<0,05 vs. PBS + PBS. #p<0,05 vs. LPS + PBS.

4.4 AVALIAÇÃO DO PESO PONDERAL

A Figura 5 demonstrou que os animais expostos à endoxemia apresentaram peso ponderal significativamente menor quando comparado aos animais que receberam apenas PBS (p<0,05). Em contrapartida, os animais expostos à endotoxemia que receberam imipramina durante 14 dias, não apresentaram uma diminuição significativa do peso ponderal (p<0,05).

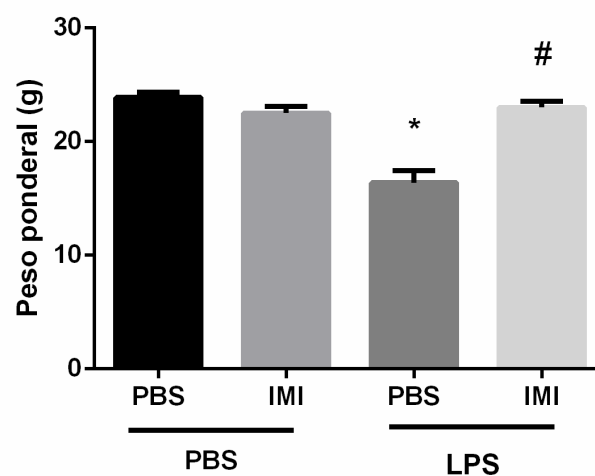


Figura 5. Avaliação do peso ponderal. Dados expressos em média e desvio padrão (n=10). *p<0,05 vs. PBS + PBS. #p<0,05 vs. LPS + PBS.

4.5 AVALIAÇÃO DO PESO DA GLÂNDULA ADRENAL

Na figura abaixo observa-se que a exposição neonatal ao LPS foi capaz de aumentar significativamente o peso da glândula adrenal quando comparado aos animais que apenas receberam PBS ($p < 0,0001$). Quando se observa o grupo de animais expostos ao LPS que receberam imipramina por 14 dias, houve uma redução significativa do peso da glândula adrenal em comparação ao grupo de animais expostos ao LPS que não recebeu imipramina ($p < 0,0001$).

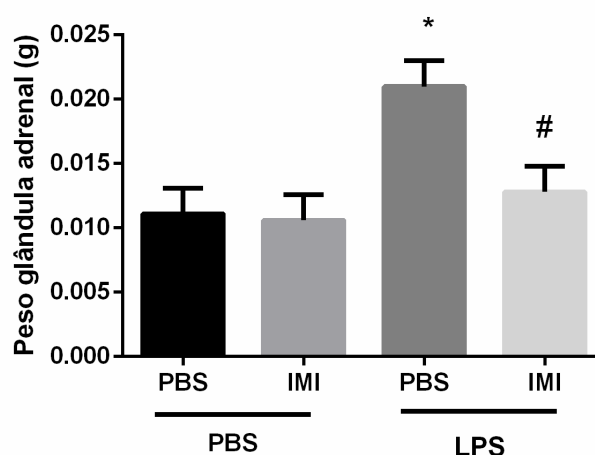


Figura 6. Avaliação do peso da glândula adrenal. Dados expressos em média e desvio padrão ($n=10$). * $p < 0,05$ vs. PBS + PBS. # $p < 0,05$ vs. LPS + PBS.

4.6 AVALIAÇÃO DO PESO DO HIPOCAMPO

Os resultados abaixo demonstraram uma redução significativa do peso do hipocampo nos animais expostos ao LPS quando comparados aos animais que receberam PBS ($p < 0,05$). Entretanto, nos animais expostos ao LPS que receberam imipramina, não foi possível observar um aumento significativo quando comparado aos animais que também foram expostos ao LPS mas não receberam a imipramina ($p > 0,05$).

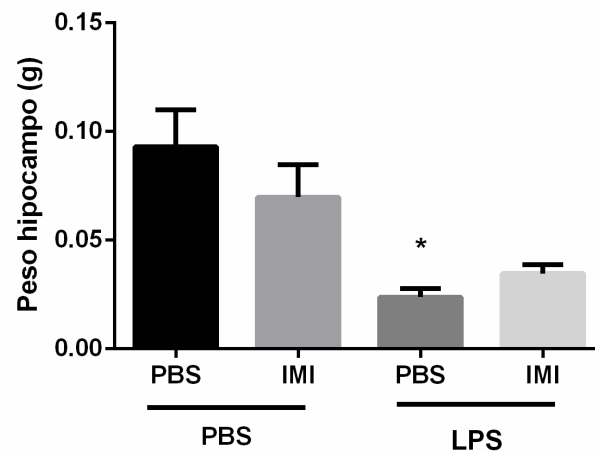


Figura 7. Avaliação do peso do hipocampo. Dados expressos em média e desvio padrão (n=10). *p<0,05 vs. PBS + PBS.

4.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOESTERONA

Os níveis plasmáticos de corticoesterona dos animais expostos ao LPS apresentaram um aumento significativo quando comparado ao grupo de animais que receberam PBS no período neonatal ($p<0,001$). Em contrapartida, o grupo exposto ao LPS que recebeu imipramina apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de corticoesterona quando comparado ao grupo exposto ao LPS que não recebeu imipramina ($p<0,001$).

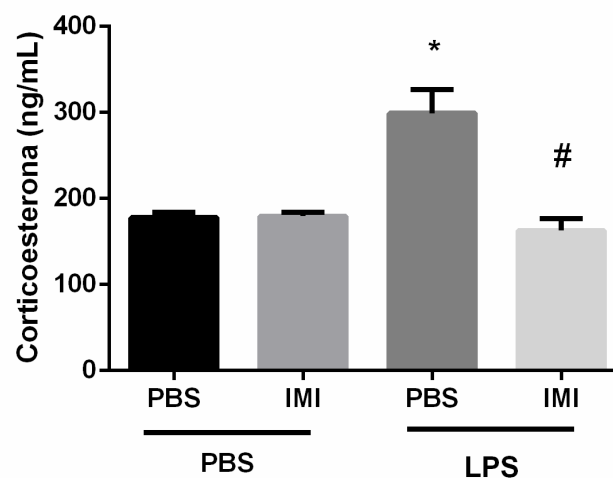


Figura 8. Avaliação dos níveis plasmáticos de corticoesterona. Dados expressos em média e desvio padrão (n=10). *p<0,05 vs. PBS + PBS. #p<0,05 vs. LPS + PBS.

4.8 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE BDNF EM TECIDO HIPOCAMPAL

Pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados neste estudo em relação aos níveis hipocampais de BDNF ($p>0,05$).

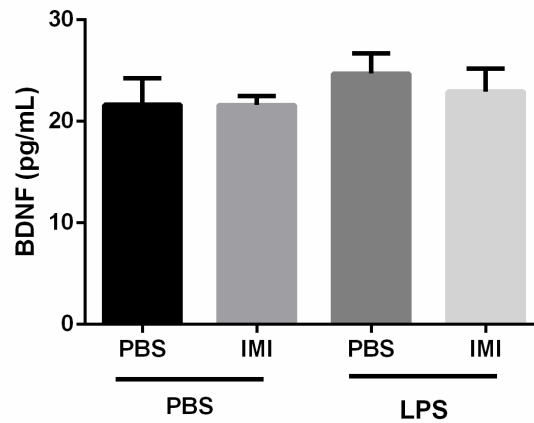


Figura 9. Avaliação dos níveis de BDNF em tecido hipocampal. Dados expressos em média e desvio padrão (n=10).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que camundongos adultos submetidos a ativação imune no período neonatal apresentaram parâmetros relacionados a depressão como anedonia, através do baixo consumo de sacarose; desamparo aprendido com maior tempo de imobilidade no teste de natação forçada; diminuição do peso ponderal; possível hiperativação do eixo HPA através do aumento no volume da glândula adrenal e elevado nível de corticoesterona no plasma e; redução do volume do hipocampo. Todos os parâmetros citados, foram revertidos com o uso de imipramina, contudo não de forma significativa para o aumento do volume do hipocampo. Os níveis de BDNF no hipocampo também foram avaliados no entanto, não apresentaram diferença significativa entre os grupos de estudo.

Estudos demonstram que a neuroinflamação no período neonatal pode levar à alterações no desenvolvimento encefálico e contribuir para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na vida adulta, incluindo a depressão^{8,115}.

A anedonia é um sintoma central da depressão e em modelos animais pode ser observada através do consumo de sacarose. Dados sugerem que o efeito das citocinas no encéfalo, em particular nas vias dopaminérgicas, levam a um estado de diminuição da motivação ou anedonia¹¹⁶. A dopamina tem um papel fundamental na motivação e na atividade motora¹¹⁶ e as citocinas demonstraram diminuir a liberação de dopamina nos gânglios da base, em associação com a motivação diminuída baseada no esforço, bem como a redução da ativação dos circuitos de recompensa no estriado ventral³⁷.

A anedonia tem sido estudada a partir de diferentes modelos de depressão. Lucca e colaboradores (2008) demonstraram que o estresse crônico variado (modelo animal clássico de depressão) induziu menos consumo de sacarose, refletindo em um comportamento anedônico nos animais¹¹⁷. Comim e colaboradores (2010) demonstraram que animais adultos submetidos a sepse por CLP apresentaram anedonia 14 dias após a indução. Nesse estudo, observou-se um aumento do comportamento anedônico nos animais adultos submetidos a endotoxemia neonatal, ou seja, 58 dias após a exposição ao LPS²³.

Um outro comportamento característico da depressão é o desamparo aprendido, observado através do tempo de imobilidade, no que resultaria em

economia de energia¹¹⁸. No presente estudo foi observado que os animais expostos à endotoxemia apresentaram um tempo significativamente maior de imobilidade. Em concordância, outros estudos associaram a privação materna (modelo animal de estresse na vida precoce) ao comportamento depressivo na idade adulta e um aumento no tempo de imobilidade^{119,120}. Um recente estudo mostrou que animais expostos ao LPS com dois dias de vida apresentaram um aumento do tempo de imobilidade quando adultos associado a alterações na memória aversiva, de habituação e de reconhecimento de objetos. Entretanto, não foi observado a presença de um comportamento relacionado a ansiedade¹²¹.

A administração de LPS é conhecida também por induzir a perda de peso em modelos animais de depressão¹²². Nesse estudo, os animais submetidos à endoxemia apresentaram peso ponderal significativamente menor quando comparado aos animais controles. Lawson e colaboradores (2013) demonstraram que a administração sistêmica de LPS em camundongos alterou o comportamento alimentar e a ingestão de alimentos e consequentemente a perda do peso ponderal¹²³. Neste estudo, entretanto, a ingestão de alimentos não foi avaliada. Outros estudos demonstraram que o estresse crônico provocou alterações nas monoaminas cerebrais envolvidas no controle e ingestão de alimentos influenciando o comportamento alimentar e a redução do peso corporal dos animais estudados^{124,125,126}.

A depressão também tem sido frequentemente associada à atividade elevada do eixo HPA. Dessa forma as alterações nas medidas neuroendócrinas observadas no aumento do volume da glândula adrenal e elevado nível de corticoesterona no plasma, encontrados nesse estudo, sugerem uma correlação positiva com os demais estudos. A hiperativação do eixo HPA, que é modulado pela secreção do CRH no hipotálamo, que ativa o ACTH na hipófise e este estimula a secreção de cortisol pela glândula adrenal, provoca um aumento dos níveis de glucocorticóides, bem como à interrupção dos mecanismos de *feedback* negativo através da diminuição, expressão e função dos receptores GR^{127,128}. As alterações no volume da glândula adrenal e nos níveis de cortioesterona encontradas no presente estudo foram observadas em animais adultos submetidos à endotoxemia no período neonatal, sugerindo um possível mecanismo de hiperativação do eixo HPA.

Essas alterações também foram encontradas em estudos anteriores semelhantes. Goshen e colaboradores (2007) demonstraram que os sintomas

relacionados a depressão, como a diminuição da preferência de sacarose e redução da exploração social, induzidos pelo modelo de estresse crônico variado em animais adultos, foram suprimidos quando estes animais recebiam um antagonista dos receptores IL-1. Os níveis hipocampais de IL-1 que também foram aumentados após o estresse crônico variado, foi diminuído após a injeção do antagonista¹²⁹. Bilbo e colaboradores (2008) demonstraram que a infecção bacteriana por *Escherichia coli* no período neonatal, aumentou as citocinas inflamatórias no encéfalo e os níveis de corticoesterona em soro nos animais quando adultos¹³⁰. Doosti e colaboradores (2013) demonstraram que a exposição neonatal ao LPS causou um aumento dos níveis de corticoesterona no plasma na idade adulta e uma diminuição do peso corporal durante o período neonatal e adolescência¹³¹. Nesse contexto vários estudos demonstraram uma ligação entre o estresse no início da vida, a atividade do eixo HPA alterada e o aumento dos sintomas relacionados a depressão, entre outros transtornos psiquiátricos mais tarde durante a vida¹¹⁻¹⁴.

Uma hipótese para os possíveis mecanismos relacionados as alterações descritas acima refere-se ao entendimento de que os níveis elevados de glicocorticóides podem influenciar a função e o comportamento neuronal, provocando perda e atrofia dos neurônios do córtex pré-frontal e hipocampo, interrompendo a conectividade cerebral em indivíduos deprimidos²². A secreção hipotalâmica de CRH é controlada pela via excitatória da amígdala e pela via inibitória do hipocampo. Dessa forma, danos hipocampais poderiam conduzir a um círculo vicioso, uma vez que a perda do controle inibitório da secreção do CRH pode resultar em uma maior secreção de cortisol e, conseqüentemente, em uma atrofia hipocampal adicional¹³². Um estudo com camundongos expostos ao LPS no início da vida demonstrou um aumento nos níveis de mRNA CRH no hipotálamo; diminuição na densidade dos GR no hipotálamo, hipocampo e córtex frontal e aumentada capacidade de resposta do HPA ao estresse na idade adulta⁴⁷. Corroborando com esse estudo, Majidi-Zolbanin e colaboradores (2013) descreveram que a diminuição da entrada de serotonina no hipocampo durante o período neonatal mostrou reduzir a expressão de GR em ratos adultos¹³³.

Considerando o exposto sobre as alterações no hipocampo e sua relação com a depressão, destaca-se a acentuada redução no volume do hipocampo nos animais adultos submetidos à ativação imune no período neonatal observado nesse estudo. As citocinas pró-inflamatórias podem influenciar negativamente o

desenvolvimento neuronal e a apoptose no hipocampo, provocando uma redução no seu volume^{134,135}. O hipocampo possui uma das maiores densidades de microglia e receptores de IL-1 β , bem como um grande potencial neurogênico na zona subventricular dos ventrículos laterais e na zona subgranular do giro dentado, dessa forma, é particularmente vulnerável à ativação imune do início da vida^{116,135}.

Wang e colaboradores (2013) demonstraram que a exposição neonatal ao LPS foi associada ao comprometimento da memória aversiva, acentuada redução no volume do hipocampo, lesões axonais de neuronios localizados na região CA1 do hipocampo, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e ativação microglial em toda a extensão do hipocampo, quando os animais completaram 70 dias de vida. A hipótese sugerida para explicar esses achados seria que subconjuntos de células gliais foram permanentemente mantidas em um estado ativado por um insulto no período neonatal¹³⁶. Musaelyan e colaboradores (2014), em um artigo de revisão, descrevem vários estudos sobre a relação da ativação imune no início da vida e alterações no hipocampo durante o desenvolvimento e na vida adulta. Dentre as alterações estão a redução da sobrevivência de neurônios recém gerados, diminuição do recrutamento de novos neurônios em redes do hipocampo e na proliferação de células progenitoras e diferenciação neuronal no hipocampo adulto. Além disso foram descritos alterações na microglia do hipocampo assemelhando-se morfológicamente à fenótipo de ativação, aumento dos níveis de IL-1 β e diminuição da citocina anti-inflamatória TGF β 1, que possui propriedades próneurogênicas¹³⁷.

Em síntese, observa-se que a redução do hipocampo está relacionada à atrofia e morte neuronal e também a redução na neurogênese, uma vez que o tratamento com antidepressivos pode promover a neurogênese e, portanto, normalizar o volume do hipocampo^{138,139}. Neste estudo, utilizou-se a imipramina por 14 dias como um controle positivo no intuito de verificar se os parâmetros observados são revertidos com o uso de um antidepressivo tricíclico clássico. A reversão dos parâmetros pode evidenciar a associação entre os achados encontrados com os apresentados durante o processo fisiopatológico da depressão. Entretanto, a diminuição do volume do hipocampo foi o único parâmetro avaliado que não foi revertido com o uso de imipramina. A reversão dos sintomas pelo tratamento farmacológico geralmente é mais precoce do que mudanças estruturais. Nem sempre os sintomas e as alterações estruturais estão temporalmente correlacionadas.

Estudos mostram que primeiramente há mudanças sintomáticas e posteriormente, com o tempo de tratamento, há mudanças estruturais encefálicas^{140,141,142}.

A redução da neurogênese observada em alguns estudos relaciona-se com a redução dos níveis de BDNF no hipocampo^{69,70,143}. Citocinas pró-inflamatórias como o IFN- α podem diminuir a proliferação celular no hipocampo e diminuir os níveis sistêmicos de BDNF²². Contudo, neste estudo, não foram encontradas alterações nos níveis de BDNF em nenhum dos grupos experimentais. A impramina também não alterou os níveis de BDNF encontrados, possivelmente em virtude do tempo de latência de 14 dias no efeito antidepressivo. Resultado semelhante foi observado no estudo de Lucca e colaboradores (2009) onde animais expostos ao paradigma do estresse crônico e variado por 40 dias não apresentaram alterações nos níveis de proteína BDNF no hipocampo, soro e líquido cefalorraquidiano¹¹⁴, entretando, apresentaram um comportamento anedônico. Esses resultados contrastam com estudos anteriores que demonstraram uma correlação entre transtornos depressivos e uma diminuição do nível de BDNF hipocampal^{58,66,144}.

Os resultados observados nesta pesquisa demonstram que a inflamação sistêmica no período neonatal alterou os parâmetros relacionados a depressão e, que essas alterações podem persistir até a idade adulta. Sugere-se que essas alterações podem ocorrer devido a vulnerabilidade do encéfalo em desenvolvimento¹⁴⁵. Durante o desenvolvimento do encefálico, um grande número de neurônios são eliminados pela apoptose para otimizar as redes neurais, sendo o equilíbrio entre a sobrevivência e morte celular um processo altamente regulado¹⁴⁶. No SNC são as células gliais que direcionam o desenvolvimento normal do encéfalo. Oligodendrócitos mielinam axônios principalmente durante o período pós-natal e a interrupção de sua função pode ser profundamente debilitante. Astrócitos medeiam a formação de sinapses no cérebro em desenvolvimento e a microglia atende a funções importantes aos neurônios de suporte e manutenção do desenvolvimento, como a apoptose¹⁴⁷. Contudo na neuroinflamação o equilíbrio entre sobrevivência e morte celular é comprometido especialmente pela ativação da microglia¹⁴⁸⁻¹⁵¹.

Em resposta a alterações no ambiente, as células microgлияis podem ser ativadas alterando sua morfologia e função. Na ativação M1, células microgлияis podem tornar-se fagocíticas, e podem sintetizar moléculas pró-inflamatórias, os radicais superóxido, glutamato, e óxido nítrico. Alternativamente, a ativação M2, tem

sido associada com uma liberação de citocinas anti-inflamatórias e fatores neurotróficos, que facilitam a cura e limitam a lesão neuronal¹⁵². Nesta linha, postula-se então que a ativação glial serve inicialmente como uma função protetora, mas a ativação contínua pode levar à liberação exagerada de citocinas pró-inflamatórias e, portanto, danos cerebrais persistentes^{153,154,155}. Harvey e Boksa (2012) em uma revisão sobre ativação imune precoce e alterações no neurodesenvolvimento apresentaram diversos estudos mostrando que a administração de LPS no período pré-natal e neonatal provocaram perda e diminuição do número de oligodendrócitos no encéfalo e expressão de proteínas relacionadas com mielina e hipomielinização, bem como déficits cognitivos, alterações na função do eixo HPA, regulação imune e resposta ao dano cerebral, como isquemia na vida adulta¹⁵⁶. Um outro estudo relacionando a ativação imune e esquizofrenia mostrou que a endotoxemia por LPS no período neonatal provocou efeitos duradouros sobre o comportamento e fatores neuroquímicos, semelhantes à esquizofrenia na idade adulta. Nesse estudo foi observado que a elevação da ativação microglial no hipocampo, córtex cerebral e tálamo, estava presente dois dias após a injeção de LPS e foi persistente até a idade adulta¹⁵⁷.

Majidi-Zolbanin e colaboradores (2013) observaram que a ativação imune neonatal pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de comportamentos semelhantes a ansiedade e depressão, hiperativação do eixo HPA e inflamação do hipocampo na idade adulta. Dentre os achados desse estudo destaca-se a expressão do marcador de células gliais e genes relacionados à IL-1 β no hipocampo de ratos recém-nascidos e adultos em resposta à administração de LPS¹⁵⁸. Sendo assim, a neuroinflamação desenvolvida e sustentada especialmente pela ativação microglial produz inúmeras alterações no encéfalo, sistema imune e endócrino²⁶, e estas, podem finalmente interferir nos neurocircuitos cerebrais e na síntese e expressão de neurotransmissores como serotonina, dopamina, noradrenalina envolvidos na fisiopatologia da depressão^{159,160,161}. À luz dessas evidências, observa-se que a desregulação de processos inflamatórios precisa ser cuidadosamente considerada desde o período pré e neonatal como um importante mecanismo fisiopatológico da depressão.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se com este estudo que camundongos expostos a endotoxemia no período neonatal apresentaram um comportamento relacionado a depressão quando adultos, evidenciado pela anedonia e desamparo aprendido associados a diminuição do peso ponderal, aumento no volume da glândula adrenal, elevado nível de corticoesterona no plasma e redução do volume do hipocampo. Entretanto, não foi observado alterações nos níveis hipocâmpais de BDNF.

Os resultados desse estudo sugerem que a neuroinflamação no início da vida pode provocar efeitos negativos no desenvolvimento encefálico e aumentar a vulnerabilidade do sistema imune e endócrino durante o desenvolvimento. Essas alterações podem causar uma pré-disposição para desencadear transtornos depressivos na vida adulta. Contudo os mecanismos pelos quais essas alterações ocorrem não foram estudados, sendo um fator limitante para uma análise mais acurada dos resultados obtidos.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que dados deste estudo possam servir para futuras pesquisas pré-clínicas e clínicas com o intuito de compreender os mecanismos envolvidos na relação entre depressão e neuroinflamação, bem como a aplicação de novas medidas terapêuticas mais eficazes para o tratamento e prevenção desse transtorno.

REFERÊNCIAS

1. ONUBR – Nações Unidas do Brasil.org [Internet]. Brasil. Acesso em 20/02/2017. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-registra-aumento-de-casos-de-depressao-em-todo-o-mundo-no-brasil-sao-115-milhoes-de-pessoas/>
2. WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Depression (2017). Acesso em 20/02/2017) Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/>
3. Quevedo J, Silva AG. Depressão: teoria e clínica. Porto Alegre: Artmed, 2013.
4. Miller HA, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psychiatry*. 2009 May 1; 65(9): 732-41.
5. Stahl, SM. Psicofarmacologia Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
6. Vismari L, Alves GJ, o-Neto JP. Depression, antidepressants and immune system: a new look to an old problem. *Rev. Psiquiatr. clín.* vol.35 no.5, 2008.
7. Jeon SW, Kim YK. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World J Psychiatry*. 2016 Sep 22; 6(3): 283–293.
8. Valkanova V., Ebmeier KP, Allan CL. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Affect Disord*. 2013 Sep 25;150(3): 736-44.
9. Flint J, Kendler KS. The genetics of major depression. *Neuron*. 2014 Feb 5; 81(3): 484-503.
10. Bădescu SV, Tătaru C, Kobylinska L, Georgescu EL, Zahiu DM, Zăgrean AM, et al. The association between Diabetes mellitus and Depression. *J Med Life*. 2016 Apr-Jun;9(2): 120-5.
11. Wilkowska A, Piłka M, Rynkiewicz A, Wdowczyk-Szulc J, Trzonkowski P, Landowski J. Increased plasma pro-inflammatory cytokine concentrations after myocardial infarction and the presence of depression during next 6-months. *Psychiatr Pol*. 2015 May-Jun;49(3): 455-64.
12. Uguz F, Akman C, Kucuksarac S, Tufekci O. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy is associated with less frequent mood and anxiety disorders in patients with rheumatoid arthritis. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009 Feb;63(1): 50-5.
13. Cattaneo A, Macchi F, Plazzotta G, , Veronica B, Bocchio-Chiavetto L, Riva MA, et al. Inflammation and neuronal plasticity: a link between childhood trauma and depression pathogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2015 Mar 31;9:40.
14. Rawdin BJ, Mellon SH, Dhabhar FS, Epel ES, Puterman E, Su Y, et al.. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav Immun*. 2013 Jul;31:143-52.
15. He H, Geng T, Chen P, Wang M, Hu J, Kang L, et al. NK cells promote neutrophil recruitment in the brain during sepsis-induced neuroinflammation. *Scientific Reports* 6, Article number: 27711 (2016).

16. Slavich G, Irwin M. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychol Bull.* 2014. 140 (3): 774-815.
17. Grigoleit JS, Kullmann JS, Wolf OT, Hammes F, Wegner A, Jablonowski S, et al. Dose-dependent effects of endotoxin on neurobehavioral functions in humans. *PLoS One.* 2011;6(12):e28330.
18. Terrando N, Fidalgo AR, Vizcaychipi M, Cibelli M, Ma D, Monaco C, et al. The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Crit Care.* 2010;14(3): R88
19. Hoogland IC, Houbolt C, Westerlo DJ, Gool WA, Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation.* 2015 Jun 6;12:114.
20. Gold P, Vieira-Machado R, Pavlatou MG. Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress. *Neural Plasticity.* 2015: ID 581976.
21. Carvalho LA, Bergink V, Wijkhuijs J, Hoogendijk JW, Birkenhager KT, Drexhage, AH. Inflammatory activation is associated with a reduced glucocorticoid receptor alpha/beta expression ratio in monocytes of inpatients with melancholic major depressive disorder. *Transl Psychiatry.* 2014 Jan; 4(1): 344.
22. Felger J, Lotrich C, Francis E. Inflammatory cytokines in depression: neurobiological mechanisms and therapeutic implications. *Neuroscience*, v. 246, p.199-229, 2013.
23. Comim CM, Omar J, Cassol-J, Constantino LC, Petronilho F, Constantino L, Stertz L, et al. Depressive-Like Parameters in Sepsis Survivor Rats . *Neurotox Res* (2010) 17:279–286
24. Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JFC, Deacon RMJ, et al. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry.* 2009 Feb 15; 65 (4): 304-312.
25. Menshanov PN, Lanshakov DA, Dygalo NN. ProBDNF is a major product of bdnf gene expressed in the perinatal rat cortex. *Physiol Res.* 2015; 64(6): 925-34.
26. Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J Neuroinflammation.* 2015 Apr 29;12:82.
27. Pittenger C, Duman RS. Stress, Depression, and Neuroplasticity: A Convergence of Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* (2008) 33, 88–109.
28. Bilbo SD, Biedenkapp JC, Avakian AD, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Neonatal Infection-Induced Memory Impairment after Lipopolysaccharide in Adulthood Is Prevented via Caspase-1 Inhibition. *Journal of Neuroscience* 31 August 2005, 25 (35) 8000-8009.
29. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, DSM-5. [American psychiatric Association.; tradução: Maria Inês Correa Nascimento...etc al]; revisão técnica: Aristides Volpato Cordioli...[et al.] – 5.ed – Porto Alegre: Artmed, 2014.

30. Dale E, Bang-Andersen B, Sánchez C. Emerging mechanisms and treatments for depression beyond SSRIs and SNRIs. *Biochemical pharmacology*, v. 95, n. 2, p. 81-97, 2015.
31. Leonard BE. The concept of depression as a dysfunction of the immune system. *Curr Immunol Rev.* agosto 2010; 6 (3): 205-212.
32. Graeff. FG, Guimarães FS. *Fundamentos de psicofarmacologia*. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.
33. Capuron L, Fornwalt FB, Knight BT, Harvey PD, Ninan PT, Miller AH, et al. Does cytokine-induced depression differ from idiopathic major depression in medically healthy individuals? *Journal of affective disorders*, v. 119, n. 1, p. 181-185, 2009.
34. Leonard BE. Psychopathology of depression. *Drugs Today (Barc)*. 2007; 43(10):705-16.
35. Neto FL, Borges G, Torres-Sanchez S, Mico JA, Berrocoso E. Neurotrophins Role in Depression Neurobiology: A Review of Basic and Clinical Evidence. *Curr Neuropsychopharmacol*. 2011 Dec; 9(4): 530–552.
36. Abelaira HM, Réus GZ, Petronilho F, Barichello T, Quevedo J. Neuroimmunomodulation in Depression: A Review of Inflammatory Cytokines Involved in this Process. *Neurochem Res* (2014) 39: 1634–1639.
37. Miller AH, Raison CL. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nat Rev Immunol*. 2016 Jan;16(1): 22-34.
38. Khairova RA, Machado-Vieira R, Du J, Manji HK. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009 maio; 12 (4): 561-578.
39. Kronfol Z, Remick DG. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J Psychiatry*. 2000; 157: 683–694.
40. Felger JC, Miller AH. Neurotherapeutic implications of brain-immune interactions. *Neuropsychopharmacology*. 2014; 39: 242–243.
41. Dhabhar FS, Burke HM, Epel ES, Mellon SH, Rosser R, Reus VI, et al. Low serum IL-10 concentrations and loss of regulatory association between IL-6 and IL-10 in adults with major depression. *Journal of psychiatric research*, v. 43, n. 11, p. 962-969, 2009.
42. Smith RS. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*. 1991 Aug; 35(4): 298-306.
43. Maes M, Smith R, Scharpe S. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology*. 1995; 20:111–116.
44. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan; 9 (1): 46-56.

45. Duman RS, Aghajanian GK, Sanacora G, Krystal JH. Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nat Med*. 2016 Mar;22(3): 238-49.
46. Raison CL, Rutherford RE, Woolwine BJ, Shuo C, Schettler P, Drake DF, et al. A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA Psychiatry*. 2013 Jan;70(1):31-41.
47. Fu H, Yang T, Xiao W, Fan L, Wu Y, Terrando N, et al. Prolonged Neuroinflammation after Lipopolysaccharide Exposure in Aged Rats. *PLoS One*. 2014 Aug 29;9(8): e106331
48. D'Mello C, Le T, Swain MG. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor- α signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci*. 2009 Feb 18;29(7): 2089-102.
49. Campbell S, MacQueen G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *Journal of Psychiatry Neuroscience*. 2004. Nov. 29 (6): 417- 426.
50. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Jan;37(1):137-62
51. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008 Oct 16; 455 (7215): 894-902.
52. Blume J, Douglas SD, Evans DL. Immune suppression and immune activation in depression. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011 Feb; 25(2): 221–229.
53. Miller AL, Haroon E, Raison CL, Felger JC . Cytokine targets in the brain: impact on neurotransmitters and neurocircuits. *Depress Anxiety*. 2013 Apr;30(4):297-306.
54. Doelen R H A van der, Deschamps W, D'Annibale C, Peeters D, Wevers RA, Zelenka D, et al. Early life adversity and serotonin transporter gene variation interact at the level of the adrenal gland to affect the adult hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Transl Psychiatry*. 2014 Jul; 4(7): e409.
55. Gotlib IH, Joormann J, Minor KL, Hallmayer J. HPA axis reactivity: a mechanism underlying the associations among 5-HTTLPR, stress, and depression. *Biol Psychiatry*. 2008 maio; 63 (9): 847-851.
56. Moron JA, Zakharova I, Ferrer JV, Merrill GA, Hope B, Lafer EM, et al. Mitogen-activated protein kinase regulates dopamine transporter surface expression and dopamine transport capacity. *J Neurosci*. 2003 Sep 17;23(24):8480-8.
57. Qianpeng H, Qiongyu L, Peixian H, Mengmeng C, Xin H, Hui F, et al. Microglia-derived IL-1 β contributes to axon development disorders and synaptic deficit through p38-MAPK signal pathway in septic neonatal rats. *Journal of Neuroinflammation* (2017) 14:52.
58. Gulyaeva NV. Interplay between Brain BDNF and Glutamatergic Systems: A Brief State of the Evidence and Association with the Pathogenesis of Depression. *(Biochemistry (Mosc))*. 2017 Mar; 82(3):301-307.
59. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Neuron*. 2006 15;59 (12):1116-27.

60. Duman RS, Li N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012 Sep 5; 367(1601): 2475–2484.
61. Quevedo J, Comim CM. Psicofármacos e Neurotrofinas. In: Oliveira IR, org. Sena EP [et al]. *Psicofarmacologia clínica*. 3ª. Ed. Medbook: 2011. P. 157-161.
62. Sampaio ME, Fortunato JJ. Biological Markers of Depression: A Review on the Expression of Neurotrophic Factors. *Rev Neurocienc* 2012;20(4): 597-603.
63. Bondar NP, Merkulova TI. Brain-derived neurotrophic factor and early-life stress: Multifaceted interplay. *J Biosci*. 2016. 41 (4), 751-758.
64. Chen H, Lombès M, Menuet DL. Glucocorticoid receptor represses brain-derived neurotrophic factor expression in neuron-like cells. *Mol Brain*. 2017 Apr 12; 10(1):12.
65. Arango-Lievano M, Lambert WM, Bath KG, Garabedian MJ, Chao MV, Jeanneteau F. Neurotrophic-priming of glucocorticoid receptor signaling is essential for neuronal plasticity to stress and antidepressant treatment. *Proc Natl Acad Sci USA A*. 2015; 112 (51): 15737-15742.
66. Castrén E, Voikar V, Rantamaki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Current Opinion in Pharmacology* 2007, 7:18–21.
67. Hayden Ep, Olino TM, Bufferd SJ, Miller A, Dougherty LR, Sheikh H I, et al. The serotonin transporter linked polymorphic region and brain-derived neurotrophic factor valine to methionine at position 66 polymorphisms and maternal history of depression: Associations with cognitive vulnerability to depression in childhood. *Dev Psychopathol*. 2013 Ago; 25 (3): 587-598.
68. Jiang H, Chen S, Li C, Lu N, Yue Y, Yin Y, et al. The serum protein levels of the tPA–BDNF pathway are implicated in depression and antidepressant treatment *Translational Psychiatry* (2017) 7, e1079.
69. Castrén E, Voikar V, Rantamaki T. The Role of BDNF and Its Receptors in Depression and Antidepressant Drug Action: Reactivation of Developmental Plasticity. *Dev Neurobiol*. 2010 Apr; 70(5):289-97
70. Popova NK, Ilchibaeva TV, Naumenko VS. Neurotrophic factors (BDNF and GDNF) and the serotonergic system of the brain. *Biochemistry*. 2017. Mar;(82(3):308-317
71. Marques A, Cizza G, Sternberg E. Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. 2007; 29(Supl I):S27-32.
72. Barden N. Implication of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the pathophysiology of depression. *Journal Psychiatry Neuroscience*. 2004 May; 29(3): 185–193.
73. Juruena MF, Agustini B, Cleare AJ, Young AH. A translational approach to clinical practice via stress-responsive glucocorticoid receptor signaling. *Stem Cell Investig*. 2017; 4:13.
74. Baes CV, Martins CM, Tofoli SM, Juruena MF. Early Life Stress in Depressive Patients: HPA Axis Response to GR and MR Agonist. *Front Psychiatry*. 2014 Jan 24;5:2
75. Williams LM, Debattista C, Duchemin AM, Schatzberg AF, Nemeroff CB. Childhood trauma predicts antidepressant response in adults with major depression:

data from the randomized international study to predict optimized treatment for depression. *Transl Psychiatry*. 2016 May 3;6:e799.

76. Tofoli SMC, Baes CVW, Martins CMS, Jurueña M. Early life stress, HPA axis, and depression *Psychology & Neuroscience*, 2011, 4, 2, 229 – 234.

77. Van Bogaert T, Vandevyver S, Dejager L, Van Hauwermeiren F, Pinheiro I, Petta I, Engblom D, et al. Tumor necrosis factor inhibits glucocorticoid receptor function in mice: a strong signal toward lethal shock. *J Biol Chem*. 2011 Jul 29;286(30): 26555-67.

78. Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*. 2011 Apr;36(3):415-25.

79. Jurueña MF, Cleare AJ, Pariante CM. The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. 2004; 26(3):189-201

80. Maes M, Bosmans E, Meltzer HY, Scharpe S, Suy E. Interleukin-1 beta: A putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? *Am J Psiquiatria*. 1993; 150:1189–1193.

81. Fitzgerald P, O'Brien SM, Scully P, Rijkers K, Scott LV, Dinan TG. Cutaneous glucocorticoid receptor sensitivity and pro-inflammatory cytokine levels in antidepressant-resistant depression. *Psychol Med*. 2006;36 :37–43.

82. Silveira RC, Procianny RS. Uma revisão atual sobre sepse neonatal. *Bol Cient Pediatr*. 2012; 01(1):29-35.

83. Campebell RC, Peiró JR, Rosa PCS, Valadão CAA, Bechara GH. Endotoxemia por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, em eqüinos: efeitos de anti-inflamatórios nas concentrações sérica e peritoneal do fator de necrose tumoral alfa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. vol.59 no.4 Belo Horizonte Aug. 2007.

84. Kullmann JS, Grigoleit JS, Wolf O, Engler H, Oberbeck R, Elsenbruch S, Forsting M, Schedlowski M, Gizewski EK. Experimental human endotoxemia enhances brain activity during social cognition. 2013 28;34(9):2217-27.

85. Sankowski R, Mader S, Valdés-Ferrer SI. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:28.

86. Pavón L, Besedovsky H, Bottasso O, Velasco-Velázquez MA, Bauer ME. Clinical and Experimental Immunomodulation 2016. *J Immunol Res*. 2017;2017:3152956.

87. Jin C, Londono I, Mallard C, Lodygensky GA. New means to assess neonatal inflammatory brain injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2015; 12: 180.

88. Favrais G, Van de Looij Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P, Stoltenberg-Didingier G, et al. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol*. 2011; 70(4):550-65.

89. Alshaikh B, Yusuf K, Sauve R. Neurodevelopmental outcomes of very low birth weight infants with neonatal sepsis: systematic review and meta-analysis. *J Perinatol*. 2013;33(7):558-64.

90. Kuypers E, Ophelders D, Jellema RK, Kunzmann S, Gavilanes AW, Kramer BW. White matter injury following fetal inflammatory response syndrome induced by

chorioamnionitis and fetal sepsis: lessons from experimental ovine models. *Early Hum Dev.* 2012;88(12):931-6.

91. Bhalala US, Koehler RC, Kannan S. Neuroinflammation and Neuroimmune Dysregulation after Acute Hypoxic-Ischemic Injury of Developing Brain. *Frontiers in Pediatrics.* 2014; 2: 144.

92. Thornton C, Rousset CI, Kichev A, Miyakuni Y, Vontell R, Baburamani AA, et al. Molecular mechanisms of neonatal brain injury. *Neurology Research International.* 2012: 506320.

93. Cowan CS, Callaghan BL, Kan JM, Richardson R. The lasting impact of early-life adversity on individuals and their descendants: potential mechanisms and hope for intervention. *Genes Brain Behav.* 2016 Jan;15(1):155-68.

94. Casey BJ, Jones RM, Hare TA. The adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Mar;1124:111-26.

95. Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 25;101(21): 8174-9.

96. Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Jernigan TL, Toga AW. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat Neurosci.* 1999 Oct;2(10):859-61.

97. Hagberg H, Mallard C, Ferriero DM, Vannucci SJ, Levison SW, Vexler ZS, et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nature Reviews Neurology* 11, 192–208 (2015)

98. Xiao J, Tan Y, Li Y, Luo Y: The Specific Protein Kinase R (PKR) Inhibitor C16 Protects Neonatal Hypoxia-Ischemia Brain Damages by Inhibiting Neuroinflammation in a Neonatal Rat Model. *Medical Science Monit.* 2016; 22: 5074–5081.

99. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, Filaninno A, Giorgi E, Schettini F, et al. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. 2016. 57, 265 e 273.

100. Schmidt AF, Kannan PS, Chougnet CA, Danzer SC, Miller LA, Jobe AH, et al. Intra-amniotic LPS causes acute neuroinflammation in preterm rhesus macaques. *Journal of Neuroinflammation.* 2016; 13(1): 238.,

101. Lima RR, Costa AMR, Souza, RD, Gomes L. Inflammation in Neurodegenerative disease. 2007

102. Hurley, L. L. e Tizabi, Y. Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. *Neurotox Res.* 2013; 23, 131-44.

103. Wight P, Takei N, Murray RM, Sham PC. Seasonality, prenatal influenza exposure, and schizophrenia. In: Susser ES, Brown AS, Gorman JM, editors. 1999.

104. Weiser M, Werbeloff N, Levine A, Livne G, Schreiber S, Halperin D, et al. Infection in childhood does not confer risk for later schizophrenia: A case-control study. *Schizophrenia Research* 2010. 1020; 124(2): 231–235.

105. Menninger KA. The schizophrenic syndromes as a product of acute infectious disease. *Archives Neurol Psychiatry* 1928; 20:464 – 48.

106. Rantakallio P, Jones P, Moring J, Von W. Association between central nervous system infections during childhood and adult onset schizophrenia and other psychoses: A 28-year follow-up. *Int J Epidemiol* 1997; 26(4): 837-843
107. Jiang X, Chen L, Shen L, Chen Z, Xu L, Zhang J, Yu X. Trans-astaxanthin attenuates lipopolysaccharide- induced neuroinflammation and depressive-like behavior in mice. 2016.
108. Bilbo SD, Schwarz JM. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Front Neuroendocrinol*. 2012 Aug;33 (3):267-86.
109. Comim CM, Freiberger V, Ventura L, Mina F, Ferreira GK, Michels M, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase 1/2 prevented cognitive impairment and energetic metabolism changes in the hippocampus of adult rats subjected to polymicrobial sepsis. *J Neuroimmunol*. 2017 Apr 15;305:167-171. 2017.02.001. Epub 2017 Feb 3.
110. Lan KM, Tien LT, Pang Y, Bhatt AJ, Fan LW. IL-1 receptor antagonist attenuates neonatal lipopolysaccharide-induced long-lasting learning impairment and hippocampal injury in adult rats. *Toxicol Lett*. 2015 Apr 2; 234(1): 30–39.
111. Singh K., Zhang L.X., Bendelja K., Heath R., Murphy SS, Padbury J.F, et al. Inter-alpha inhibitor protein administration improves survival from neonatal sepsis in mice. *Pediatr Res*. 2010;68:242–7
112. Monleon S, D'Aquila P, Parra A, Simon VM, Brain PF, Willner P. Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology*, p.453-457, 1995.
113. Nunes, Emerson Arcoverde; HALLAK, Jaime Eduardo Cecílio. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, p.528-543, 2014.
114. Porsolt RD. Animal model of depression. *Biomedicine*. 1979 Jul;30(3):139-40.
115. Ménard C, Pfau ML, Hodes GE, Russo SJ. Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):62-80.)
116. Pizzagalli DA. Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model. *Annu Rev Clin Psychol*. 2014;10:393–423.
117. Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Pereira JG, Stertz L, Gavioli EC, et al. Chronic mild stress paradigm reduces sweet food intake in rats without affecting brain derived neurotrophic factor protein levels. *Curr Neurovasc Res*. 2008 Nov;5(4):207-13.
118. Chadman KK, Yang M, Crawley JN. Criteria for Validating Mouse Models of Psychiatric Diseases. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Jan 5; 150B(1): 1–11.
119. Réus GZ, Dos Santos MA, Abelaira HM, Ribeiro KF, Petronilho F, Vuolo F, Colpo GD, Pfaffenseller B, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Imipramine reverses alterations in cytokines and BDNF levels induced by maternal deprivation in adult rats. *Behav Brain Res*. 2013a;242:40-6.
120. Valvassori SS, Varela RB, Arent CO, Dal-Pont GC, Bobsin TS, Budni J, Reus GZ, Quevedo J. Sodium butyrate functions as an antidepressant and improves

cognition with enhanced neurotrophic expression in models of maternal deprivation and chronic mild stress. *Curr Neurovasc Res*. 2014;11(4):359-66.

121. Comim CM, Bussmann RM, Simão SR, Ventura L, Freiburger V, Patrício JJ, et al. Experimental Neonatal Sepsis Causes Long-Term Cognitive Impairment. *Mol Neurobiol*. 2016 Nov;53(9):5928-5934.

122. Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2010 Oct;13(10):1161-9.

123. Lawson MA, McCusker RH, Kelley KW. Interleukin-1 beta converting enzyme is necessary for development of depression-like behavior following intracerebroventricular administration of lipopolysaccharide to mice. *J Neuroinflammation*. 2013 May 1;10:54.

124. Dess NK, Raizer J, Chapman CD, Garcia J. Stressors in the learned helplessness paradigm: effects on body weight and conditioned taste aversion in rats. *Physio Behav*. 1988; 44: 483–490.

125. Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int*. 2003; 42: 107-14.

126. Bekris S, Antoniou K, Daskas S, Papadopoulou-Daifoti Z. Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav Brain Res*. 2005 Jun 3; 161 (1): 45-59.

127. Ellis S, Mouihate A, Pittman QJ. Neonatal programming of the rat neuroimmune response: stimulus specific changes elicited by bacterial and viral mimetics. *J Physiol*. 2006;571:695–701.

128. Bilbo SD, Schwarz JM. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Front Neuroendocrinol*. 2012 Aug;33(3):267-86.

129. Bilbo SD, Yirmiya R, Amat J, Paul ED, Watkins LR, Maier SF. Bacterial infection early in life protects against stressor-induced depressive-like symptoms in adult rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2008 Apr;33(3):261-9.

130. Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*. 2008 Jul;13(7):717-28.

131. Doosti MH, Bakhtiari A, Zare P, Amani M, Majidi N, Babri S, et al. Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2013; 43:55–65.

132. Kandel E, Schwartz J, Jessel TM, Siegelbaum S, Hudspeth, AJ. *Princípios de Neurociências*. 5ª. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

133. Majidi-Zolbanin J, Azarfarin M, Samadi H, Enayati M, Salari AA. Adolescent fluoxetine treatment decreases the effects of neonatal immune activation on anxiety-like behavior in mice. *Behav Brain Res*. 2013 Aug 1;250:123-32.

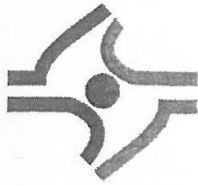
134. Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2012 Apr; 122(4):1156-63.

135. Van den Heuvel LG, Mathai S, Davidson JO, Lear CA, Booth LC, Fraser M, et al. Synergistic white matter protection with acute-on-chronic endotoxin and subsequent asphyxia in preterm fetal sheep. *J Neuroinflammation*. 2014;11:89.
136. Wang K, Fan L, Kaizaki A, Pang Y, Cai Z, Tien L. Neonatal Lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience* 2013;234: 146–57.
137. Musaelyan K, Egeland M, Fernandes C, Pariante CM, Zunszain PA, Thuret S. Modulation of Adult Hippocampal Neurogenesis by Early-Life Environmental Challenges Triggering Immune Activation. 2014, Article ID 194396, 10 pages
138. Wei-Wei C, Xia ZWH. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2016;13:3391–3396.
139. Wilkinson MB, Xiao G, Kumar A, LaPlant Q, Renthall W, Sikder D et al. Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J Neurosci*. 2009 Jun 17;29(24):7820-32.
140. Dhir A. Investigational drugs for treating major depressive disorder. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017 Jan;26(1):9-24.
141. El-Hage W, Leman S, Camus V, Belzung C. Mechanisms of antidepressant resistance. *Front Pharmacol*. 2013 Nov 22;4:146.
142. Haenisch B, Bönisch H. Depression and antidepressants: insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacol Ther*. 2011 Mar;129(3):352-68.
143. Smith PL, Hagberg H, Naylor AS, Mallard C. Neonatal peripheral immune challenge activates microglia and inhibits neurogenesis in the developing murine hippocampus. *Dev Neurosci*. 2014;36(2):119-31.
144. Bondar NP, Merkulova TI. Brain-derived neurotrophic factor and early-life stress: Multifaceted interplay. *J Biosci*. 2016 Dec;41(4):751-758.
145. Raison CL, Miller AH. Malaise, melancholia and madness: the evolutionary legacy of an inflammatory bias. *Brain Behav Immun*. 2013 Jul;31:1-8.
146. Kraft AD, Harry GJ. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2011 Jul;8(7):2980-3018.
147. Bilbo SD, Smith SH, Schwarz JM. A Lifespan Approach to Neuroinflammatory and Cognitive Disorders: A Critical Role for Glia. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012 Mar; 7(1): 24–41.
148. Bland ST, Beckley JT, Young S, Tsang V, Watkins LR, Maier SF et al. Enduring consequences of early-life infection on glial and neural cell genesis within cognitive regions of the brain. *Brain Behav Immun*. 2010 Mar;24(3):329-38.
149. Kempuraj D, Selvakumar GP, Thangavel R, Ahmed ME, Zaheer S, Raikwar SP, et al. Mast Cell Activation in Brain Injury, Stress, and Post-traumatic Stress Disorder and Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Front. Neurosci.*, 12 December 2017.

150. Maddux AB, Douglas IS. Is the developmentally immature immune response in paediatric sepsis a recapitulation of immune tolerance? *Immunology*. 2015 May;145(1):1-10.
151. Machado JR, Soave DF, da Silva MV, de Menezes LB, Etchebehere RM, Monteiro ML, et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:269681.
152. Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T et al. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2015 Aug 6;300:141-54.
153. Thornton C, Rousset CI, Kichev A, Miyakuni Y, Vontel R, Baburamani AA, et al. Molecular Mechanisms of Neonatal Brain Injury. *Neurology Research International*. Volume 2012 (2012), Article ID 506320, 16 pages.
154. Anne-Laure Diné, Corinne Joffre, Pierre Trifilieff, Agnes Aubert, Aline Foury, Pascale Le Ruyet, Sophie Layé. Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood. *J Neuroinflammation*. 2014; 11: 155.
155. Baumeister D, Akhtar R, Ciufolini S, Pariante CM, Mondelli V. Childhood trauma and adulthood inflammation: a meta-analysis of peripheral C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α . *Mol Psychiatry*. 2016 May;21(5):642-9.
156. Harvey L, Boksa P. Prenatal and postnatal animal models of immune activation: relevance to a range of neurodevelopmental disorders. *Dev Neurobiol*. 2012 Oct;72(10):1335-48. doi: 10.1002/dneu.22043. Epub 2012 Aug 23.
157. Zhu F, Zhang L, Ding YQ, Zhao J, Zheng Y. Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. *Brain Behav Immun*. 2014 May;38:166-74.
158. Majidi J, Kosari-Nasab M, ASalari AA. Developmental minocycline treatment reverses the effects of neonatal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors, hippocampal inflammation, and HPA axis activity in adult mice. *Brain Research Bulletin*. 2016. Volume 120, Pages 1-13.
159. Duman R, Aghajanian G. Synaptic Dysfunction in Depression: Novel Therapeutic Targets. *Science*. 2012;338:68–72.
160. Phillips ML, et al. Identifying predictors, moderators, and mediators of antidepressant response in major depressive disorder: neuroimaging approaches. *Am J Psychiatry*. 2015;172:124–138.
161. Baek IS, Park JY, Lin Han P. Chronic antidepressant treatment in impairs stress-coping ability. *Exp. Neurobiol*. 2015 Jun; 24(2): 156-168.

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 10 de abril de 2017
Registro na CEUA (código): 17.004.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Clarissa Comim Cassol

Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Avaliação dos comportamentos relacionados a depressão em animais adultos submetidos à endotoxemia por LPS no período neonatal”, registrada com o nº 17.004.4.01.IV, sob a responsabilidade de Clarissa Comim Cassol - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 11/04.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão