

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

Lucas dos Santos da Silva

**POTENCIAL ENVOLVIMENTO DA METILAÇÃO DE HISTONAS COM O  
MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DA DEPRESSÃO MAIOR**

Porto Alegre

2020

Lucas dos Santos da Silva

**POTENCIAL ENVOLVIMENTO DA METILAÇÃO DE HISTONAS COM O  
MECANISMO FISIOPATOLÓGICO DA DEPRESSÃO MAIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca  
Moreira

Coorientador: Prof. Dr. Roberto Farina de Almeida

Porto Alegre

2020

## Dedicatória

Dedico esta dissertação  
Em especial aos meus pais, minha família,  
amigos e a todos que colaboraram nesta caminhada.

## Agradecimentos

Agradeço a minha família pela preocupação com meu sucesso e bem-estar pessoal e profissional, mas principalmente meus pais Adão e Roseli, pelo amor, apoio, carinho, confiança, dedicação e incentivo dados a mim não só durante minha formação acadêmica, mas sim na vida!

Ao professora José Cláudio, confesso que faltam palavras para demonstrar minha gratidão e admiração pelo profissional e pessoa que és. Agradeço por ter me proporcionado a oportunidade de integrar teu grupo de pesquisa, pela amizade, apoio, confiança, conhecimento, e orientação durante minha caminhada. Agradeço também a professora Maria Luiza Saraiva Pereira, por ter me recebido em seu laboratório e aberto as portas do PPG.

Ao meu coorientador Roberto Almeida, que apesar da distância sempre esteve presente. Agradeço pela amizade, bons momentos compartilhados, risadas, apoio, confiança, incentivo que sempre me recebi durante nossa caminhada. Digo nossa caminha pois, realmente construímos esse trabalho juntos! És um exemplo de profissional!

Agradeço a professora Jade de Oliveira e o Matheus pela amizade, bons momentos de descontração, troca de conhecimento e aprendizado durante a realização da técnica de imunofluorescência.

Às minhas duas iniciações científicas, Camila e Luiza, minhas amigas, companheiras de biotério, de comportamento, finais de semana, “surtos” e festas. Costumo brincar que sou o pai de vocês, mas às vezes vocês são minhas mães. Agradeço por todo carinho e dedicação que vocês possuem comigo e com nosso trabalho.

Agora a parte mais difícil, falar de forma resumida sobre cada um de vocês do lab 32. Vou iniciar dizendo que querendo ou não são a minha segunda família pois, convivo com vocês mais do que com meus pais. Agradeço por todos momentos de descontração, carinho, troca de conhecimento, apoio, até pelos dramas e surtos, mas principalmente por terem se tornado pessoas especiais para mim. Mesmo cada um possuindo seu jeito e personalidade, posso dizer que amo vocês e levaria partes e lembranças de cada um de vocês comigo! Portanto, muito obrigado lab 32.

Agradeço aos meus amigos Ana, Bianca, Bruna, Carol, Daniela, Izadora, Larissa, Laura, Marina e Paulo, que me acompanham e presenciam meus anseios, conquistas e também surtos. Amo vocês!

Aos funcionários da secretaria (Cléia, Giordano e Douglas), a ajuda de vocês foi essencial.

Aos funcionários do biotério, mas principalmente a Fabíola e Ariele pela contribuição em manutenção e conhecimento sobre cruzamento dos animais.

Agradeço ao financiamento do CNPq, à UFRGS e demais docentes e discentes do Departamento de Bioquímica, pela possibilidade de fazer ciência de alto nível dentro do Brasil.

# Sumário

<b>Parte I</b> .....	1
<b>Resumo</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	4
<b>1. Introdução</b> .....	6
<b>1.1 Transtornos Psiquiátricos</b> .....	6
<b>1.2 Transtorno Depressivo Maior</b> .....	8
<b>1.3 Estresse, Resiliência e Transtorno Depressivo Maior</b> .....	15
<b>1.4 Modificações Epigenéticas</b> .....	18
<b>1.5 Estresse Crônico Moderado e Imprevisível</b> .....	23
<b>2. Objetivos</b> .....	27
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	27
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	27
<b>Parte II</b> .....	28
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	29
<b>3.1 Animais</b> .....	29
<b>3.2 Procedimento Experimental</b> .....	29
3.2.1 Teste de consumo de sacarose .....	30
3.2.2 Campo aberto .....	30
3.2.3 Reconhecimento de objetos .....	31
3.2.4 Labirinto em Y .....	31
3.2.5 Teste de borrifagem de sacarose ( <i>Splash test</i> ) .....	32
3.2.6 Nado forçado .....	32
<b>3.3 Coleta de amostras</b> .....	32
<b>3.4 Análise de dano e reparo ao DNA</b> .....	33
3.4.1 Micronúcleos .....	33
3.4.2 Sensibilidade do DNA à DNase .....	33
3.4.3 Reparo de DNA .....	34
<b>3.5 Análise de metilação em histonas</b> .....	34
3.5.1 Extração de histonas .....	34
3.5.2 <i>Western blot</i> .....	35
<b>3.6 Análise da expressão gênica</b> .....	36

3.6.1 Extração de RNA .....	36
3.6.2 Confeção de DNA complementar (cDNA).....	37
3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (RT-qPCR) .....	37
<b>3.7 Imunofluorescência .....</b>	<b>38</b>
<b>3.8 Análise estatística.....</b>	<b>39</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Testes comportamentais.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Dano e Reparo ao DNA.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4 Expressão gênica.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5 Imunofluorescência .....</b>	<b>45</b>
<b>Parte III .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Discussão .....</b>	<b>48</b>
<b>6. Considerações finais.....</b>	<b>58</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>60</b>
<b>8. Lista de figuras.....</b>	<b>94</b>

## **Parte I**

## Resumo

**Santos, Lucas. Potencial envolvimento da metilação de histonas com o mecanismo fisiopatológico da depressão maior.** Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil, 2020.

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma patologia psiquiátrica grave e multifatorial. Avanços científicos vêm demonstrando que fatores ambientais, como o estresse, tem importante influência na etiologia da TDM. Em estudos pré-clínicos, o Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI) é um modelo animal com alto potencial translacional, que mimetiza situações que os seres humanos podem experimentar cotidianamente, tornando-se relevante para ampliar os estudos no campo do TDM. Atualmente, estudos indicam que ativação de fatores epigenéticos podem estar envolvidos com o sistema glutamatérgico no TDM. As histonas estão sujeitas a uma complexidade de modificações epigenéticas, como por exemplo, a metilação. Esta, pode alterar a interação núcleo-histona, o que acaba por influenciar a expressão gênica. Nesta perspectiva, mesmo que alguns estudos já tenham sido realizados, uma investigação pormenorizada considerando o modelo de TDM do ECMI e as possíveis modificações na histona 3 lisina 4 trimetilada (H3K4me3), H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3 e H3K79me3 se fazem necessário. Desta maneira, esta dissertação teve como objetivo geral, investigar modificações epigenéticas em resíduos de lisina da histona 3 que podem estar relacionadas com genes astrocitários e neuronais em ratos Wistar submetidos ao ECMI. Para isto, foram utilizados 29 ratos Wistar, sendo 8 controles e 21 submetidos ao ECMI durante 42 dias. Posterior ao ECMI, foram realizados testes comportamentais e em seguida, os animais foram eutanasiados para a retirada do sangue, medula óssea femural, córtex, hipotálamo e hipocampo, os quais foram utilizados em técnicas para verificar possível dano ao DNA, estado de cromatina, padrão de trimetilação das lisinas específicas e expressão gênica. A partir dos resultados comportamentais, foi possível subdividir o grupo dos animais que foram submetidos ao ECMI em animais com comportamento tipo-depressivo e resilientes ao estresse. Quando avaliamos as alterações na H3, verificamos que as modificações H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 e H3K36me3 possuíam um padrão de trimetilação tecido-específico. Ainda, analisamos a expressão de genes astrocitários e neuronais e observamos diferença de expressão tecido-específico também. Desta maneira, observamos que a H3K27me3 e H3K9me3 podem estar relacionadas com a regulação da homeostase de glutamato em animais tipo-resilientes e tipo-depressivo enquanto, a H3K4me3 e H3K36me3 com o aumento da neurogênese e neurodiferenciação nos animais com o fenótipo tipo-resiliente. Por fim, concluímos que as modificações epigenéticas podem estar envolvidas com o desenvolvimento do fenótipo tipo-depressivo interagindo com os transportadores de glutamato e que o fenótipo tipo-resiliente pode ser desenvolvido por um aumento de neurogênese que pode proporcionar um equilíbrio da homeostase glutamatérgica.

## Abstract

**Santos, Lucas. Potential involvement of histone methylation with the pathophysiological mechanism of major depression.** Masters dissertation, Post-graduation Program of Biological Sciences: Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil, 2020.

Major Depressive Disorder (MDD) is a serious and multifactorial psychiatric disorder. Scientific advances have shown that environmental factors, such as stress, have an important influence on the etiology of MDD. In preclinical studies, Chronic Moderate and Unpredictable Stress (ECMI) is an animal model with high translational potential, which mimics situations that humans can experience daily, becoming relevant to expand studies in the field of MDD. Currently, studies indicate that activation of epigenetic factors may be involved with the glutamatergic system in TDM. Histones are subject to a complexity of epigenetic changes, such as methylation. This can alter the nucleus-histone interaction, which ends up influencing gene expression. In this perspective, even if some studies have already been carried out, a detailed investigation considering the TDM model of ECMI and the possible modifications in trimethylated lysine 4 histone 3 (H3K4me3), H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3 and H3K79me3 are necessary. Thus, this dissertation had the general objective of investigating epigenetic changes in lysine residues of histone 3 that may be related to astrocytic and neuronal genes in Wistar rats submitted to ECMI. For this, 29 Wistar rats were used, 8 controls and 21 submitted to ECMI for 42 days. After ECMI, behavioral tests were performed and then the animals were euthanized to remove blood, femoral bone marrow, cortex, hypothalamus and hippocampus, which were used in techniques to check for possible DNA damage, chromatin status, pattern trimethylation of specific lysines and gene expression. From the behavioral results, it was possible to subdivide the group of animals that underwent ECMI in animals with type-depressive behavior and resilient to stress. When we evaluated the changes in H3, we found that the changes H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 and H3K36me3 had a tissue-specific trimethylation pattern. Furthermore, we analyzed the expression of astrocytic and neuronal genes and observed a difference in tissue-specific expression as well. Thus, we observed that H3K27me3 and H3K9me3 may be related to the regulation of glutamate homeostasis in type-resilient and type-depressive animals, while H3K4me3 and H3K36me3 with the increase in neurogenesis and neurodifferentiation in animals with the resilient type phenotype. Finally, we conclude that epigenetic changes may be involved with the development of the type-depressive phenotype interacting with glutamate transporters and that the type-resilient phenotype can be developed by an increase in neurogenesis that can provide a balance of glutamatergic homeostasis.

## Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico receptor do ácido
CID	Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5 <sup>o</sup> edição
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 6 <sup>o</sup> edição
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatórios
ECMI	Estresse Crônico Moderado e Imprevisível
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLAST	Transportador de glutamato-aspartato
GLT-1	Transportador de glutamato-1
GLN	Glutamina
GR	Receptor de glicocorticóide
GS	Glutamina sintetase
GLU	Ácido Glutâmico/Glutamato
H2A	Histona 2 A
H2B	Histona 2 B
H3	Histona 3
H4	Histona 4
HPA	Hipotálamo-Hipófise adrenal
IL	Interleucina
K	Lisina
KDM	Lisinas Desmetilases

KMT	Lisinas Metiltransferases
Me1	Monometilação
Me2	Dimetilação
Me3	Trimetilação
miRNA	MicroRNAs
mRNA	RNA mensageiro
NE	Norepinefrina
NMDA	N -metil-D aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNARE	Receptores solúveis de proteínas de ligação à proteína de fusão sensíveis à N-etilmaleimida
SYN2	Sinaptofisina 2
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
vGLUT	Transportador de glutamato vesicular
3'UTR	3 linha não traduzida
5-HT	Serotonina

## **1. Introdução**

### **1.1 Transtornos Psiquiátricos**

Os transtornos psiquiátricos e de humor são relativamente comuns e tornaram-se cada vez mais frequentes (Whiteford et al., 2013; Wong & Licinio, 2001). Apesar que para alguns dos transtornos a mortalidade seja elevada, seu grande impacto é sobre a morbidade, uma vez que essas desordens representam aproximadamente um terço da incapacidade dos indivíduos acometidos (Collins et al., 2011; Eaton et al., 2008). Esses distúrbios causam perturbações em aspectos fisiológicos, comportamentais, sociais, e ainda, geram prejuízos significativos na qualidade de vida dos pacientes (Vos et al., 2012).

Os transtornos de humor afetam cerca de 20% da população americana ao decorrer da vida, e a estimativa de prevalência anual é próximo aos 10%. Diante disso, destacamos o Transtorno Depressivo Maior (TDM), o qual ocupa 6,7% dos casos (Kessler et al., 1993; Kessler et al., 2005; Reinhart et al., 2012). Nesse contexto, os dados evidenciam que aproximadamente 35 milhões de adultos nos Estados Unidos serão acometidos por ao menos um episódio de depressão maior durante a vida (Kessler et al., 2003).

No Brasil, o Conselho Nacional da Saúde revela que aproximadamente 23 milhões de pessoas possuem algum tipo de transtorno mental, onde 5 milhões dos brasileiros apresentam transtornos graves e persistentes. Conforme a Associação Brasileira de Psiquiatria, a política de saúde mental enfatiza que a esquizofrenia e transtorno bipolar como as patologias mais graves e o TDM e ansiedade e depressão como as mais prevalentes (Xavier et al., 2014).

Devido ao impacto social que esses transtornos causam, novas hipóteses estão sendo colocadas em questão e explicações estão sendo buscadas para patologias

consideras complexas, as quais contemplam desordens comportamentais, como a grande maioria dos transtornos psiquiátricos (Ahn et al., 2006; Rose, 2013; Strohman, 2003). A partir dos anos 2000, iniciou-se a pensar que processos que relacionam saúde e patologia não poderiam ser satisfatoriamente elucidados e fundamentados nos indivíduos acometidos por desordens psiquiátricas, utilizando modelos unidirecionais pois, deve-se levar em consideração a sobreposição de sintomas (comorbidades) que esses transtornos possuem (Levey et al., 2019; Ruderfer et al., 2018; Whitton, Treadway & Pizzagalli, 2015). Desta maneira, estudos de associação se tornaram mais comuns, juntamente com a utilização de modelos animais que possuem uma maior perspectiva translacional, mimetizando de forma mais consistente os achados observados na clínica (Bogi et al., 2017; Lima-Ojeda, Rupprecht & Baghai, 2017). Com isso, surgem mecanismos epigenéticos como alvos de estudos e possíveis biomarcadores para transtornos psiquiátrico

Mesmo que muitos estudos venham sendo realizados a fim de esclarecer a patogênese dos transtornos psiquiátricos, os mecanismos relacionados à sua etiologia ainda não são elucidados por completo (Möller et al., 2016) e seus métodos de diagnóstico ainda são discutidos (Doernberg & Hollander, 2016; Lee et al., 2016).

Desde de 1893, a OMS vem publicando revisões com a Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID), onde estas correspondem aos transtornos mentais e de comportamento (Doernberg & Hollander, 2016). O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª edição (DSM-V) estrutura o diagnóstico com base no número e tipo de sintomas (descrição clínica), exclusão de outros distúrbios, acompanhamento e histórico familiar (Robins & Guze, 1970; Spitzer & Endicott & Robins, 1978; Krystal & State, 2014). Já se sabe que há risco de herdabilidade de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) relacionando

quatro transtornos com sobreposição, como o transtorno bipolar e TDM, TDM e esquizofrenia, e por fim, TDM e transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics et al., 2013). Sugere-se que o risco genético prejudica processos fundamentais do neurodesenvolvimento e função cerebral, surgindo fenótipos que não estão somente relacionados a variantes genéticas presentes na linha germinativa. Esses fatores que contribuem para o desenvolvimento do fenótipo podem ser dedicados a variantes ambientais, modificadores poligênicos, microbioma, sistema imune e mecanismos epigenéticos.

Devido a fatores ambientais, bioquímicos, genéticos, neuroendócrinos e neuroimunes, a fisiopatologia do TDM é um ponto crítico que necessita de elucidações (State & Levitt, 2011; State & Sestan, 2012; MacNamara, Kotov, & Hajcak, 2016).

## **1.2 Transtorno Depressivo Maior**

O TDM é um espectro heterogêneo com condições clínicas caracterizadas por humor triste ou irritável, alterações cognitivas e perda de interesse ou prazer por pelo menos duas semanas (Kendel, 1980; Karyotaki et al., 2016), afetando a qualidade de vida do indivíduo acometido. Além disso, sintomas clínicos como alterações psicomotoras, apatia, impotência, desesperança, distúrbio de sono (retardo ou sonolência frequente) e redução no grau de concentração devem ser observados (Reus et al., 2016).

Estudos vêm indicando que o sexo feminino possui duas vezes maior risco de desenvolver eventos depressivos iniciais em comparação ao sexo masculino (Green, Flash & Reiss, 2019; Kessler et al., 1993). A idade em que são desencadeados episódios depressivos é variada, sugerindo que esta patologia prevalece por toda vida e depende da intensidade dos gatilhos (Flint & Kendler, 2014). Quando os episódios

depressivos são duradouros e com intensidade moderada ou grave podem ocasionar ideações suicidas. De acordo com a OMS em 2017, cerca de 800 mil pacientes depressivos cometeram suicídio, sendo a segunda principal causa de morte entre pessoas com idade de 15 a 29 anos.

O TDM não causa apenas déficits na qualidade de vida dos pacientes acometidos, mas provoca decréscimo significativo da saúde de pacientes com outras comorbidades como diabetes e câncer, por exemplo (Geue et al., 2019; Moussavi et al., 2007; Réus et al., 2019).

Os dados demonstram-se preocupantes, uma vez que OMS revela que esta doença atualmente afeta aproximadamente 350 milhões de pessoas no mundo, abrangendo 11,3 milhões de brasileiros (Bortolato et al., 2016; Karyotaki et al., 2016). Ainda, estima-se que em 2030 o TDM será a segunda patologia incapacitante do mundo (Kaufman et al., 2016).

Devido a alta prevalência e relevância do TDM, se faz necessário compreender de maneira aprofundada os diferentes mecanismos que estão envolvidos na fisiopatologia desta desordem. Diante disso, algumas hipóteses já foram exploradas, dentre elas podemos citar:

Hipótese 1 – Hipótese Monoaminérgica da TDM: Atualmente, sabe-se que neurotransmissores do sistema monoaminérgicos como norepinefrina e serotonina desempenham um papel central na fisiopatologia do TDM. Disfunções nesses sistemas resultam em uma sinalização anormal desses neurotransmissores que *per se* podem afetar a homeostase cerebral e com isso levar ao desenvolvimento da TDM. Ademais, estudos indicam que alterações nas monoaminas cerebrais podem ainda levar a alterações no tônus glutamatérgico, assim como em enzimas metabólicas (Ramsay, Deurwaerdère & Di Giovanni, 2016). Essa teoria serviu como base para a

produção medicamentos com ação antidepressiva (com ampla comprovação clínica), uma vez que aumentam a biodisponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos na fenda sináptica seja pela inibição de suas recaptações ou da enzima responsável pelas suas degradações (Perez-Caballero et al., 2019).

Os neurônios serotoninérgicos estão localizados principalmente no núcleo dorsal da rafe no tronco cerebral. A serotonina (5-HT) é liberada na fenda sináptica, onde pode ser recaptada por autorreceptores (normalmente acoplados a proteínas G inibitória) localizados nos neurônios pré-sinápticos ou captada pelos transportadores serotoninérgicos presentes nos neurônios pós-sinápticos. Os autoreceptores de 5-HT são peças-chave em relação ao mecanismo auto-inibitório da atividade serotoninérgica, sendo capazes de inibir a atividade elétrica, excitabilidade, síntese ou liberação de 5-HT, e ainda, regulam a atividade dos transportadores por vias sinalizadoras intracelulares, a fim de manter a homeostase do sistema (Kurlansik & Maffei, 2016; Liu et al., 2019). Os receptores de 5-HT representam uma família, sendo distribuídos dependendo do subtipo celular (Di Giovanni et al., 2016).

Já a fonte primária de norepinefrina (NE) é advinda dos neurônios localizados no locus coeruleus, que está situado no assoalho do quarto ventrículo. Esse neurotransmissor é responsável por regular a função encefálica de diversas maneiras. O locus coeruleus recebe projeções aferentes de algumas regiões encefálicas como amígdala, córtex e hipotálamo. Da mesma maneira que a 5-HT, a NE também possui autotransportadores ( $\alpha$ -adrenoceptores) que regulam com caráter inibitório a liberação de NE, ao passo que os  $\beta$ -adrenoceptores aumentam a liberação de NE após a sua ativação. Em grande parte, a liberação de NE é modulada através da recaptação deste neurotransmissor pelo neurônio pré-sináptico (Aston-Jones et al., 1986; Feinstein, Kalinin & Braun, 2016; Liu et al., 2019).

Os antidepressivos tricíclicos atuam tanto no sistema serotoninérgico quanto no sistema noradrenérgico, bloqueando a recaptação dos neurotransmissores 5-HT e NE de maneira eficiente, uma vez que observa-se que pacientes depressivos diminuem os sintomas somáticos da patologia (Liu et al., 2019). Por outro lado, pacientes com genótipos combinados de polimorfismo de transportador NET (NET182C) e 5-HT (5-HTTLPR) apresentam piores respostas ao tratamento e as interações funcionais com outros sistemas se mostram comprometidas (Enge et al., 2014).

Hipótese 2 – Hiperativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA): A exposição a fatores estressantes é um dos riscos para o desenvolvimento de TDM (Iob, Kirschbaum & Steptoe, 2019). A ativação do eixo HPA é uma forma de resposta ao estresse (Iob, Kirschbaum & Steptoe, 2018). Devido a isso, estudos em pacientes com hiperativação do eixo HPA demonstram que estes indivíduos apresentam concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, bem como, proteína C reativa. Destaca-se que além de TDM, a alteração deste eixo está envolvida com outros distúrbios inflamatórios, endócrinos e neurais (Acabchuk et al., 2017; Jackson, Kirschbaum & Steptoe, 2017). Devido a relevância desta hipótese para esta dissertação, ela será melhor abordada no tópico 1.3.

Hipótese 3 - Processos Inflamatórios: Alguns autores relatam que doenças que envolvem processos inflamatórios aumentam o risco de TDM (Herder & Hermanns, 2019). Estudos populacionais evidenciam que doenças somáticas que envolvem mecanismos fisiopatológicos inflamatórios aumentam o risco para o desenvolvimento de transtornos de humor, como TDM. Doenças como diabetes (Réus e tal., 2019) e artrite reumatoide (Fiest et al., 2017) e doenças infecciosas como hepatite (Yeoh et al., 2018) e sepse (Askim et al., 2018) têm sido relacionadas a uma resposta inflamatória, aumentando o risco de TDM. Um estudo nacional dinamarquês

demonstrou que há um risco maior de 45% de desenvolver transtornos de humor após a hospitalização devido a doenças autoimunes e um aumento de 62% no risco de desenvolver transtornos de humor após hospitalização por infecções (Benros et al., 2013). De acordo com a literatura, marcadores inflamatórios tem sido aumentados em pacientes com TDM (Howren et al., 2009; Liu, Chun-Man Ho & Mak, 2012; Wang et al., 2019; Wium-Andersen et al., 2013).

Associações relacionadas ao efeito de diversos estímulos ambientais, bem como inflamação foram comprovados, uma vez que foram encontrados níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em amostras sanguíneas de pacientes acometidos pela TDM. (Haroon, Raison & Miller, 2012; Köhler et al., 2016).

Buscando entender o processo pró-inflamatório no desenvolvimento do TDM, observa-se que estressores ambientais ativam o sistema nervoso autônomo devido a liberação de catecolaminas, e isto resultará na ativação de seus receptores nas células do sistema imune, o que acaba estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Leonard, 2010).

Diante disso, destaca-se que as diferentes hipóteses da TDM, possuem uma íntima relação com alterações relacionadas com neurogênese e neuroplasticidade cerebral. Respostas inflamatórias crônicas no Sistema Nervoso Central (SNC) acabam por estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias de forma excessiva, podendo diminuir concentrações de neurotrofinas, resultando em uma neuroplasticidade prejudicada e neurogênese alterada. Neurogênese prejudicada corrobora com disfunções cognitivas observadas nos transtornos de humor (Leonard, 2010; Tafet & Nemeroff, 2015). O aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- $\alpha$  demonstram alterar a neurotransmissão serotoninérgica, uma vez que essas

citocinas estimulam o receptor de 5-HT e assim, reduzindo concentrações de 5-HT no SNC (Zhu, Blakely & Hewlett, 2006). Além disso, a inflamação pode desregular a homeostase do sistema glutamatérgico (Dantzer & Walker, 2014; Haroon et al., 2018; Leonard, 2017 McNally, Bhagwagar & Hannestad, 2008; Yin et al., 2019).

Hipótese 4 – Envolvimento dos astrócitos no TDM: O glutamato é um dos neurotransmissores com maior prevalência liberados pelos neurônios excitatórios no SNC, porém, frente a uma hiperativação deste sistema de neurotransmissão, pode haver aumento da liberação ou retardo no mecanismo de captação através dos receptores astrocitários (Mahmoud et al., 2019).

Os astrócitos são células do SNC que desempenham funções fundamentais para manter a homeostase do SNC e atividade neuronal. Este tipo celular possui conexões com neurônios e vasos sanguíneos, onde fornecem nutrientes aos neurônios, controlam a quantidade de fluxo sanguíneo que está presente no SNC e mantêm a integridade da barreira hematoencefálica (Eulenburg & Gomez, 2010; Felger, 2018; Mahmoud et al., 2019 Souza et al., 2019).

Para manter a homeostase do sistema, os astrócitos possuem transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) dependentes de sódio ( $\text{Na}^+$ ), os quais são responsáveis pela maioria da captação do glutamato extracelular (Rose et al., 2016). Os EAATs possuem cinco isoformas, o EAAT-1, EAAT-2, EAAT-3, EAAT-4 e EAAT-5. As isoformas EAAT-1 e EAAT-2 em roedores são conhecidos como GLAST (transportador de glutamato-aspartato) e GLT-1 (transportador de glutamato-1), respectivamente. O GLT-1 possui uma expressão constante no SNC adulto, enquanto a expressão de GLAST é correlacionada positivamente com a atividade sináptica. Esses transportadores representam a maioria de EAATs expressos em astrócitos e são responsáveis pela absorção de até 90% do glutamato presente na fenda sináptica

(Eulenberg & Gomez, 2010; Mahmoud et al., 2019). A sinapse glutamatérgica tripartite acontece da seguinte forma, resumidamente: O glutamato presente na fenda sináptica é captado pelos receptores GLAST e GLT-1, localizados na membrana das células gliais (em maior proporção pelos astrócitos). Nestas células, este neurotransmissor é convertido em glutamina (Gln) através da ação da enzima glutamina sintetase (GS). A glutamina é transportada até os neurônios pré-sinápticos, onde nesses neurônios é convertida em glutamato novamente, através da ação da enzima glutaminase. O glutamato presente no neurônio pré-sináptico é transportado pelos transportadores de glutamato vesicular (vGLUTs). Na membrana plasmática do neurônio pré-sináptico e na membrana da vesícula está presente um complexo proteico chamado de receptores solúveis de proteínas de ligação à proteína de fusão sensíveis à N-etilmaleimida (SNARE), e a entrada de  $Ca^{+}$  a partir de canais voltagem dependente e a fusão da vesícula com a membrana do neurônio pré-sináptico faz com que o neurotransmissor seja liberado para a fenda sináptica (conforme demonstrado na figura 1). Na fenda sináptica, o glutamato pode ser absorvido pelos astrócitos e iniciar o ciclo novamente (Popoli et al., 2011).

Leonard (2018) relata que a inflamação e a ativação do eixo HPA são componentes normais da resposta ao estresse, mas quando o estresse é crônico, resulta na ativação dos macrófagos periféricos, da microglia central e da hipercortisolemia (figura 2). As citocinas pró-inflamatórias, além de ativar o eixo HPA e, assim, aumentar a síntese de cortisol, também ativam a via do triptofano-quinurenina. Isso favorece a síntese do ácido quinolínico agonista do receptor N - metil-D aspartato (NMDA), aumentando o estresse oxidativo, por consequência a neuroinflamação, que acaba por alterar a neurogênese e a homeostase do sistema (Gruden et al., 2018).

### **1.3 Estresse, Resiliência e Transtorno Depressivo Maior**

Atualmente é de amplo conhecimento que o estresse afeta a qualidade de vida dos indivíduos. Estudos indicam que há uma grande associação entre estresse e o TDM, sendo esta apoiada por diversos estudos (Arnau-Soler et al., 2019; Caspi et al., 2003; Herbison et al., 2017; Jang, Lee & Kim, 2019; Yang et al., 2015).

O TDM pode ser desenvolvido a partir de múltiplos fatores, incluindo magnitude, cronicidade, previsibilidade, controlabilidade e mediadores biológicos, pois cada indivíduo responde de forma diferente à situação estressante na qual está sendo exposto. Os mediadores biológicos incluem ativação de cascatas neurais e endócrinas que podem induzir eventos moleculares que irão alterar mecanismos de susceptibilidade ao TDM (Tafet & Nemeroff, 2016). O indivíduo que está sob situação de estresse pode responder de maneira adaptativa, na qual seus mecanismos moleculares irão responder de forma bem-sucedida, controlando a situação de estresse, porém, se os eventos estressores possuírem caráter excessivo e prolongado, poderá resultar em alterações não adaptativas, que por sua vez, contribuem para o desenvolvimento de patologias como o TDM (Gold, 2014; Yang et al., 2015).

Os estressores ambientais afetam os seres humanos cotidianamente, sendo transmitidos por vias sensoriais até estruturas do SNC, como o tálamo e suas projeções que interagem com a amígdala que por sua vez também se projetam para o córtex pré-frontal (Kaufman et al., 2000; Heim et al., 2008). As projeções do tálamo para a amígdala promovem reações de excitação e como consequência, a ativação do sistema nervoso autônomo e do eixo HPA (Tafet & Nemeroff, 2016).

O eixo HPA (demonstrado na figura 3) é regulado por áreas como amígdala, substância cinzenta periaquedutal e o hipocampo. Em situações de estresse, os

neurônios hipotalâmicos secretam o hormônio liberador de corticotrofina (Marques et al., 2016). Diante disso, os níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) se elevará, ocasionando a liberação do hormônio cortisol (corticosterona em roedores) pela glândula adrenal. O cortisol se liga aos receptores mineralocorticoides tipo I e glicocorticoides (GRs) tipo II, os quais sofrerão alterações conformacionais para permitir seu reconhecimento, ligação a elementos de resposta a região promotora de genes relacionados (Holsboer, 2000; Ramos Ade et al., 2014). O cortisol regula a atividade do eixo HPA através de ciclos de *feedback* negativo, necessitando de ligação a receptores de GR localizados no hipocampo e na hipófise. Os GRs no hipocampo participam da retroalimentação negativa agindo sobre o hipotálamo (Holsboer, 2000; Tafet & Nemeroff, 2015).

O hipocampo é uma região cerebral que está envolvida diretamente com o eixo HPA. Pacientes com TDM apresentam volume hipocampal reduzido, bem como função diminuída, resultado em maior sensibilidade conforme a intensidade do estresse (Vythilingam et al., 2002).

Em resposta a estressores de maneira aguda, a amígdala estimula o eixo HPA ocasionando na síntese e liberação de cortisol. Com isto, espera-se que o cortisol realize efeitos metabólicos generalizados, pois é necessário para manter ou restaurar a homeostase do eixo. Quando isto acontece haverá a estimulação da gliconeogênese, regulação negativa de processos inflamatórios, contribuindo para lidar com a situação estressante e restaurar a homeostase do eixo (Tafet & Nemeroff, 2015). Mas já a ativação crônica do eixo HPA pode alterar mecanismos fisiológicos, como o circuito de *feedback* negativo, resultando na hiperativação (Chrousos, 2009). A exposição prolongada a níveis elevados de cortisol pode induzir alterações nos

neurônios hipocampais, induzindo a redução da ramificação dendrítica e inibindo a neurogênese (Baumeister, Lightman & Pariante, 2014).

Apesar de diversos estudos terem tido sucesso em demonstrar alguns dos mecanismos envolvidos com o TDM, novos estudos a fim de melhor compreender esta desordem devem ser conduzidos. Além de fatores genéticos e ambientais possuírem envolvimento e contribuição para a patogênese do TDM, alguns indivíduos após a exposição a tais fatores não desenvolvem o TDM, sendo este fenótipo conhecido como resiliência (Réus et al, 2018).

A resiliência é definida como uma manutenção adaptativa do comportamento, desenvolvimento e fisiologia diante alguma adversidade (Navrady et al., 2017). Esse fenótipo pode ser desenvolvido devido a respostas bem sucedidas do organismo ao estresse, permitindo com que ele se “adapte”. Quando relacionamos resiliência e estresse, uma característica que possivelmente esteja relacionada à resistência ou vulnerabilidade é o estilo de *coping*. O *coping* ativo é definido pela resposta comportamental que um indivíduo utiliza para minimizar o dano físico, psicológico e social em uma determinada situação. Este processo ativo de responder e de se adaptar às adversidades para tentar manter a homeostase, é conhecido como alostase, podendo recrutar mediadores inflamatórios, metabólicos e neuromoduladores, que são capazes de interagir uns com os outros, promovendo adaptação (Southwick et al., 2005).

Pode-se inferir que o TDM pode ser resultado de múltiplas interações entre o efeito de estressores físicos e ambientais e fatores individuais de vulnerabilidade. Atualmente, além de fatores genéticos clássicos (como SNPs e microssatélites), neuroinflamatórios e alterações neuroendócrinas, novos estudos inferem que mecanismos epigenéticos possam estar envolvidos com o desenvolvimento desta

patologia, bem como o desenvolvimento de resiliência (Lockwood, Su & Youssef, 2015; Shen, Song & Wang, 2019; Si et al., 2018; Sun et al., 2018; Tavakolizadeh et al., 2017).

#### **1.4 Modificações Epigenéticas**

O genoma humano possui aproximadamente 6 bilhões de nucleotídeos agrupados em 23 pares de cromossomos, os quais são organizados em uma estrutura chamada de cromatina (Waddington, 1959).

A relação entre genética, desenvolvimento, influência ambiental e hereditariedade iniciou a ser estudada nos anos 50 (Waddington, 1959). Atualmente, conhecemos esta interação como epigenética. Este termo significa “acima do genoma” e seus mecanismos referem-se a fatores estruturais e moleculares que alteraram a expressão gênica sem modificar a sequência nucleotídica do DNA (Peña & Nestler, 2018). Os mecanismos epigenéticos envolvem tipos de modificações químicas nas histonas, DNA, RNA e alterações em proteínas que atuam como reguladoras.

As histonas foram descobertas há mais de cem anos. Essas proteínas interagem para formar uma estrutura de sustentação capaz de compactar o DNA. A compactação é eficiente quando o DNA é envolto em torno de um octâmero globular de histonas composto por um tetrâmero de histonas H3/H4 e dois dímeros de H2A/H2B. Esta estrutura de DNA-proteína é denominada de nucleossomo, o qual forma a unidade básica e altamente organizada da cromatina. Porém, atualmente sabe-se que esta organização pode ser afetada por diversas modificações que podem interferir na organização e função da expressão gênica (Hauer & Gasser, 2017; Peña & Nestler, 2018).

A nível de modificação em RNA, os microRNAs (miRNAs) compõem uma família de pequenas moléculas de RNAs endógenos, os quais possuem aproximadamente de 18 a 25 nucleotídeos, são moléculas não-codificadores de proteínas, que se anelam a sequências complementares encontradas na região 3' não-traduzida (3' UTR) dos RNAs mensageiros (mRNAs) diminuindo ou bloqueando a expressão gênica (Lin & Tsai, 2019). Além disso, os miRNAs tem sido amplamente estudados em diversas patologias como autismo (Mellios et al., 2017), esquizofrenia (Wang et al., 2019), TDM (Fries et al., 2019), transtorno bipolar (Gruzdev et al., 2019), câncer (Shukla et al., 2019) e entre outras, devido a sua relevância.

A modificação epigenética considerada mais estudada e estável é a metilação de DNA. Esta alteração consiste em uma modificação covalente, onde um grupamento metil é adicionado no carbono 5 da citosina (5mC) nas díades citosina-guanina, onde influencia a transcrição sem alterar a sequência estrutural (Fuks, 2005; Lister et al., 2013; Portela & Esteller, 2010). No DNA as metilações se agrupam em torno dos promotores gênicos, onde passam a serem chamadas de ilhas CpGs. Quando hipermetilados, os promotores tendem a reprimir a expressão gênica (Guo et al., 2012). Essa modificação também está envolvida no câncer (Ding, Chen & Shi, 2019), TDM (Xiang et al., 2019), esquizofrenia (Hu et al., 2019) e transtorno bipolar (Li et al., 2019).

As interações entre as histonas e o DNA podem ser alteradas por modificações covalentes nas caudas N e C terminal das histonas (Sun; Kennedy & Nestler, 2012). Algumas modificações epigenéticas foram identificadas, como a acetilação, metilação, ribosilação e ubiquitinação, por exemplo. Entretanto, os mecanismos que tem chamado atenção em relação ao TDM são a acetilação e metilação de histonas (Chen et al., 2019; Rodriguez-zas et al., 2018; Qiao et al., 2019).

A acetilação de histonas é um dos mecanismos mais estudados atualmente, esta modificação diminui a afinidade dos octâmeros de histonas pelo DNA resultando no relaxamento da cromatina, permitindo com que fatores de transcrição se liguem ao DNA, favorecendo a expressão gênica (Liu et al., 2014). Esse estado de cromatina é conhecido como eucromatina, porém, este estado não permanece desse modo com outros mecanismos epigenéticos (Peña et al., 2014). Este mecanismo está associado com algumas patologias como câncer (Senapati et al., 2019), TDM (Rodriguez-zas et al., 2018), esquizofrenia (Večeřa et al., 2017), transtorno bipolar (Mccarthy et a., 2010) e entre outras.

O mecanismo de regulação epigenética melhor caracterizado no cérebro é a metilação das histonas (Penã et al., 2014). A metilação de resíduos de lisina na histona 3 (H3) pode ocorrer em diferentes estados, podendo conter 1 (me1), 2 (me2) ou 3 (me3) grupos metil em seu grupamento amina, sendo estes estados podendo implicar em diferentes funções na cromatina. As alterações mais exploradas são H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 e H3K79. Esta notável modificação atua de forma diferente da acetilação, pois, o resultado da alteração depende da lisina a qual foi acometida pelo resíduo metil, podendo favorecer a ativação ou repressão da expressão gênica. Em geral, os resíduos K4, K36 e K79 da H3 são encontrados perto de unidades de transcrição ativa, portanto, eles favorecem a expressão gênica relaxando a cromatina para que fatores de transcrição possam interagir com o DNA. Já os resíduos K9 e K27 favorecem a compactação da cromatina, portanto, estes resíduos quando metilados favorecem o silenciamento da expressão gênica (como demonstrado na figura 4).

No ano 2000, foi descoberta a primeira histona lisina metiltransferase (Jenuwein et al., 2000) e desde então uma família extensa de enzimas

metiltransferases estão sendo identificadas (Kouzarides, 2007; Martin & Zhang, 2005). A grande parte das metiltransferases compartilham um domínio SET como núcleo catalítico e possui especificidade de estado de modificação e de resíduo. (Yue, Oppermann & Klose, 2009).

Há diversas enzimas lisinas metiltransferases (KMTs), porém, cada resíduo possui suas enzimas específicas. Enquanto as KMTs catalisam a adição do grupamento metil aos resíduos a nível pós-traducional, as enzimas lisinas desmetilases (KDMs) removem este grupamento, modulando a estrutura da cromatina (David Allis et al., 2007). Foram identificadas que a família das enzimas KMT2 (KMT2A, KMT2B, KMT2C e KMT2D) catalisam a adição do grupamento metil no resíduo K4 e as enzimas KDM5A e KDM5C são responsáveis por remover o grupamento metil da H3 (Rao & Dou, 2015; Shilatifard, 2006). Cruceanu e colaboradores associaram esta modificação no resíduo da K4 com transtorno bipolar e TDM, uma vez que verificaram um aumento da marca H3K4me3 em pacientes que foram diagnosticados com transtorno bipolar e TDM que cometeram suicídio. Ainda, verificaram que o enriquecimento H3K4me3 no promotor do gene sinaptofisina 2 (SYN2) (correlacionada com a regulação super-expressa de sinaptofisina), isso sugere que a desregulação da sinaptofisina nos transtornos do humor é mediada em parte por mecanismos reguladores epigenéticos (Cruceanu et al., 2013). Além disso, na literatura é relatado que a metilação nesse resíduo também está envolvida com neurodiferenciação, neurogênese e pluripotência celular (Guenther et al., 2007; Meshorer et al., 2006). Ainda, foi visto por imunofluorescência em cultura celular de osteoclastos, que quando há um quadro neuroinflamatório resulta em uma redução significativa de H3K4me e por consequência diminuiu a osteoclastogênese induzida por lipopolissacarídeo (Kirkpatrick, Kirkwoord & Woster, 2018).

No resíduo K9, a família de enzimas KMT1 (KMT1A, KMT1B, KMT1C, KMT1D e KMT1E) são responsáveis por catalisar a adição do grupamento metil, enquanto as enzimas KDM1, KDM3 e KDM4 são responsáveis por desmetilar este resíduo (Hyun et al., 2017; Nakayama et al., 2001). Sabe-se que H3K9me é essencial para manter a homeostase celular, e que a metilação neste resíduo altera a expressão de genes que estão relacionados com ciclo celular, neurogênese e neurodiferenciação (Fiszbein & Kornblihtt, 2016; Pappa et al., 2019). Além disso, H3K9me3 está envolvida com o circuito de recompensa (eixo HPA) que é intimamente relacionado com o desenvolvimento de anedonia em modelos animais, sendo a anedonia um dos principais sintomas de depressão (Pathak et al., 2017).

As enzimas KMT6A e KMT6B são responsáveis por metilar o resíduo K27 e as KDM6A, KDM6B e KDM6C por desmetilar o resíduo (Hyun et al., 2017; Lee et al., 2006). O resíduo K27 está relacionado com a sinapse glutamatérgica, uma vez que há um aumento da H3K27me3 no promotor do gene que codifica para o receptor de glutamato metabotrópico 2 (Kurita et al., 2013). Foi visto também que esta H3K27me3 está relacionada com mecanismo de recompensa, bem como a outra metilação de caráter repressor (H3K9me3) (Pathak et al., 2017).

A adição do grupamento metil no resíduo K36 é regulada por várias KMTs, porém, a única que catalisa a adição do grupamento metil no estado me3 é a KMT3A, mas por outro lado, essa lisina pode ser desmetilada por KDM2A, KDM2B, KDM4A, KDM4B e KDM4C (Edmunds, Mahadevan & Clayton, 2008; Li, 2013; Sinha et al., 2009). A H3K36 possui uma relação com neurodesenvolvimento e já foi visto que quando há uma diminuição no nível de metilação neste resíduo, resulta em atraso no neurodesenvolvimento bem como em déficits cognitivos e motores (Hyun et al., 2017). Em animais resilientes a intensidade de metilação foi mais elevado que em animais

com fenótipo tipo-depressivo após o estresse por derrota social. Além disso, quando há uma hipermetilação no resíduo K36 há uma menor síntese de IL-6 e TNF- $\alpha$ , diminuindo o quadro neuroinflamatório (Kirkpatrick, Kirkwood & Woster, 2018).

Por fim, o resíduo K79 possui apenas uma KMT conhecida, a KMT4. Curiosamente, essa enzima é a única que não possui um domínio SET identificada até o momento e esse resíduo metilado não possui enzima desmetilase ainda elucidada (Farooq et al., 2016; Shilatifard, 2006; Van Leeuwen, Gafken & Gottschling, 2002). Na literatura, a H3K79 tem sido associada com a proliferação celular e desenvolvimento de células granulares no cerebelo e também na via de síntese do colesterol (Bovio et al., 2018). Ainda, o resíduo K79 tem sido associado com diferenciação de osteoclastos (Gao & Ge, 2018). Entretanto, ainda não há grandes resultados na área de neurociências.

Devido ao TDM ser uma patologia multifatorial, os fatores mencionados acima tornam-se interessante para estudo, para aos poucos elucidar qual a contribuição de cada mecanismo para a prevenção ou progressão do transtorno para futuramente utilizá-los para tornar o tratamento da depressão mais eficiente. Chamo atenção que todos os mecanismos podem atuar ao mesmo tempo, porém, em intensidades diferentes.

### **1.5 Estresse Crônico Moderado e Imprevisível**

Como mencionado anteriormente nesta dissertação, indivíduos, quando expostos à situações estressantes a longo prazo, de maneira incontrolável e imprevisível em algumas situações é possível que a sinalização desencadeada pelo estresse pode ser precipitante no desenvolvimento de TDM (Kessler, 1997).

Com o objetivo de podermos ampliar de maneira pormenorizada o entendimento sobre as mais diversas desordens que acometem os seres humanos, modelos animais *in vivo* são utilizados com a finalidade de mimetizar determinada patologia, (Willner, 1997).

Nos anos 80, houve uma série de estudos de Katz e colaboradores nos quais ratos foram expostos a diversos agentes estressores graves (Katz & Hersch, 1981; Katz et al., 1981a; Katz et al., 1981b; Katz & Baldrighi, 1982), com isto, os animais mudavam seu comportamento após o estresse. Além disso, os animais postulados como estressados, não consumiam água nem mesmo quando adicionado sacarose, utilizando a solução adocicada como recompensa. Neste sentido, observou-se que estes animais tinham prejuízos comportamentais, e que esses comportamentos caracterizavam um fenótipo de anedonia, mas esse fenótipo era revertido quando administrados antidepressivos. Período após, os trabalhos de Zacharko e colaboradores (Zacharko et al., 1983; Zacharko, Bowers & Anisman, 1984) demonstraram que isso estava relacionado com uma alteração no mecanismo de recompensa desses animais.

No final dos anos 80, Willner e colaboradores utilizaram o modelo experimental, utilizando estressores de caráter moderado, surgindo o modelo de Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI). O ECMI é um modelo utilizado com o objetivo de mimetizar o TDM em roedores, baseado em pesquisas clínicas e pré-clínicas. Esse modelo consiste na exposição dos animais a estressores de caráter moderado, variados e imprevisíveis de maneira repetida, submetendo os animais a uma série de “microestimuladores”, tornando o modelo de estresse crônico mais ético, sem a aplicação de estressores dolorosos para o animal, como o empregado por Katz e colegas (Hill et al., 2012).

O modelo replica muitas das mudanças comportamentais, bioquímicas vistas no TDM e possui alto potencial translacional (Hill et al., 2012). O consumo de sacarose é semelhante às deficiências no processamento de recompensa, que são a base do diagnóstico de anedonia, um sintoma central da depressão maior (Associação Americana de Psiquiatria e Força-Tarefa da Associação Americana de Psiquiatria no DSM-IV, 2000). Além disso, no ano de 2018 foi publicada uma meta-análise a qual demonstra que o ECMI é um dos modelos de maior confiabilidade, uma vez que mimetiza em até 60% dos sintomas observados em pacientes da clínica (Antoniuk et al., 2018).

Em relação a neurobiologia do modelo, particularmente no sistema monoaminérgico há um aumento da atividade da monoamina oxidase A e B após o ECMI, com isto, sugere-se que por consequência há uma redução no conteúdo de 5-HT. Em geral, os estudos demonstram que há um déficit na neurotransmissão de 5-HT na maioria das regiões do cérebro anterior, como córtex pré-frontal e hipocampo (Bhutani, Bishnoi & Kulkarni, 2009; Chen et al., 2007). Já no sistema noradrenérgico, os dados são um pouco conflitantes, alguns autores relatam que há um comprometimento na neurotransmissão, enquanto outros autores relatam que não há alteração (Gold & Chrousos, 2002). Em relação a neurotransmissão dopaminérgica, foi demonstrado que há uma redução de dopamina bem como de seus metabólitos primários, revelando que há uma redução na neurotransmissão após ECMI (Ahmad et al., 2010; Hill et al., 2016).

Já em relação ao glutamato, poucos estudos estudaram o efeito do ECMI sobre este neurotransmissor. O que sabe-se é que no hipocampo há um aumento da expressão do GLT-1 e isto pode estar relacionada com a tentativa do sistema em

manter a homeostase glutamatérgica (Garcia-Garcia et al., 2009; Raudensky & Yamamoto, 2007).

Considerando que o eixo HPA é intimamente relacionado com o estresse, no modelo de ECMI já foi demonstrado que níveis do hormônio liberador de corticotropina são elevados em estruturas como amígdala, córtex, hipocampo e hipotálamo (Guo et al., 2009 Pan et al., 2010). Em geral, observa-se que o modelo mimetiza a neurobiologia observada em indivíduos diagnosticados clinicamente com TDM moderada (Raadsheer, 1994), bem como como pacientes com ideações suicidas (Merali et al., 2004).

Estudos demonstram que elevados níveis de glicocorticoides podem ser decorrentes a modificações epigenéticas. Resultados demonstram que a regulação do gene que codifica para a proteína de ligação FK 5 (FKBP5) pode ser modulada por alterações epigenéticas e isto pode resultar em prejuízos na neurotransmissão glutamatérgica e alterações de genes astrocitários (Wei et al., 2016; Kim et al., 2016; Shepard & Coutellier, 2018; Sun et al., 2017). Mesmo que com poucos estudos, há evidências que indicam os mecanismos epigenéticos como peças chave para o desenvolvimento do fenótipo de resiliência (Lopizzo et al., 2019; Matosin, Halldorsdottir & Binder, 2018; Nasca et al., 2017).

Visto que o modelo uma é capaz de mimetizar ambos os fenótipos e separá-los para podermos explorar a neurobiologia da TDM e resiliência, este se torna o melhor modelo para buscarmos melhor compreensão sobre a neurobiologia de animais suscetíveis ao TDM e animais resilientes.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar as possíveis modificações epigenéticas, em ratos Wistar submetidos ao modelo de depressão do Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI).

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Investigar em ratos Wistar o efeito do ECMI nos parâmetros comportamentais relacionados com comportamentos do tipo-depressivo e resiliente;
2. Investigar modificações epigenéticas nos resíduos de lisina 4, 9, 27, 36 e 79 da histona 3;
3. Analisar o estado de cromatina;
4. Verificar possível dano e reparo ao DNA;
5. Avaliar a expressão de genes que codificam para transportadores e enzimas relacionadas com a sinapse glutamatérgica;
6. Avaliar parâmetros como neuroinflamação, neurogênese, reatividade astrocitária e alterações na permeabilidade de barreira hematoencefálica.

## Parte II

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Animais**

Os experimentos foram realizados utilizando 29 ratos machos (50 dias) Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com ~270 gramas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL-UFRGS), e alojados no biotério setorial do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, mantidos em um ciclo de doze horas de claro/escuro (luz a partir das 7:00 horas) em temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### **3.2 Procedimento Experimental**

Após habituação de 7 dias ao biotério setorial, os animais foram separados em grupos experimentais: controles (8 animais) e animais submetidos ao ECMI (21 animais). Em seguida, os animais foram analisados individualmente frente ao consumo de sacarose basal (*Baseline*) durante o período de 5 semanas.

O protocolo do ECMI (Czéh et al., 2015; Cryan & Mombereau, 2004; Palmfeldt et al., 2016; Willner, 2005) consiste na exposição dos animais a repetidos cronogramas de eventos estressores físicos e ambientais de intensidade moderada e de caráter imprevisível (dia 1 – a maravalha das caixas foi umedecida com 300mL de água, por um período de 17 horas (h); dia 2 – as caixas foram inclinadas ( $45^\circ$ ) por um período de 5h; dia 3 – período de 5h de privação de água e comida; dia 4 – confinamento em tubos por um período de 1h; dia 5 – pareamentos dos animais de diferentes caixas por um período de 2h; dia 6 – 36h com iluminação intermitente; e dia 7 – período de 4h sob luz estroboscópica), conforme demonstrado na figura 5. Neste modelo, para haver imprevisibilidade em relação aos diferentes tipos de estresse, o cronograma dos eventos foi alterado de maneira com que os estressores não

pudessem ser repetidos no mesmo dia da semana anterior. Passada uma semana de todas as seções de estresse, foram realizados testes comportamentais, os quais logo serão apresentados, a fim de verificar o fenótipo dos animais.

### **3.2.1 Teste de consumo de sacarose**

Para o teste de consumo a sacarose, que foi realizado de acordo com (Bergström et al., 2008; Palmfeldt et al., 2016), os animais foram inicialmente treinados a consumir uma solução de sacarose palatável (1,5%), a fim de verificar o consumo médio dos animais (*Baseline*). Esse treinamento durou 4 semanas. Antes da realização do teste, os animais foram privados de água e alimentação por um período de 14 horas.

O teste consiste na exposição de uma garrafa com solução de sacarose previamente pesada por um período de 1 hora. Após esse período, houve novamente a mensuração do peso da garrafa com o objetivo de verificar a quantidade de solução de sacarose consumida pelos animais.

### **3.2.2 Campo aberto**

A atividade locomotora foi analisada nos ratos dos diferentes grupos experimentais utilizando o teste do campo aberto em sessão de 10min (Almeida et al., 2017; Szewczyk et al., 2008). O teste foi realizado em dois dias consecutivos para investigar memória de habituação. Cada animal foi colocado individualmente na periferia do aparato (50x50x50cm, Comprimento x Largura x Altura) contendo todas as paredes e o chão pintados de preto. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo e, para analisá-los, utilizamos o software ANY-maze®. A distância

total percorrida pelos animais, foi avaliada em cada uma das diferentes exposições ao campo aberto.

### **3.2.3 Reconhecimento de objetos**

A fim de avaliar a atividade exploratória e memória dos animais (Rossato et al., 2007), foi realizado o teste de reconhecimento de objetos, e este consiste em 2 sessões. Foi utilizado o mesmo aparato explicado na seção 3.2.2 e o mesmo tempo de teste (10 minutos). Na primeira sessão são colocados dois objetos iguais que serão considerados familiares (FO). Posterior 24h, foi realizada a segunda sessão, onde um dos objetos foi substituído por um novo objeto (NO). Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo e para analisar os vídeos, utilizamos o software ANY-maze®. Para analisar a taxa de exploração destes animais foram contabilizados o tempo de exploração de cada animal em determinado objeto.

### **3.2.4 Labirinto em Y**

A memória de curta duração avaliada pela análise do comportamento de alternância espontânea dos animais durante uma única sessão utilizando o labirinto em Y (Lazaroni et al., 2012). Cada animal foi colocado no mesmo braço do labirinto, o deixando locomover-se durante 5 minutos. Considera-se alternância a entrada em sequência em três diferentes braços (ABC, por exemplo) e o número de entradas corretas (ABC, BCA, por exemplo). Foi analisado também o tempo em que o animal ficou em cada braço do labirinto. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo e para analisar os vídeos, utilizamos o software ANY-maze®. Os resultados foram analisados realizando a porcentagem de alternâncias.

### **3.2.5 Teste de borrifagem de sacarose (*Splash test*)**

O “*splash test*” é um teste comportamental para analisar o auto-cuidado/auto-limpeza dos animais, representado pelo tempo de *grooming*. Para a realização do teste, borrifa-se uma solução de sacarose com concentração de 3% no dorso do animal, até que fique úmido (Ducottet & Belzung, 2004). Em seguida, os animais foram colocados em caixas transparentes e o tempo de latência e autocuidado foram cronometrados durante 15 minutos.

### **3.2.6 Nado forçado**

Nesse teste, inicialmente os animais são colocados individualmente em cilindros *plexiglass* (80cm de altura, 25cm de diâmetro) contendo água com 39cm de profundidade (em nível suficiente para que o animal não consiga apoiar-se no fundo) a  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 min durante a sessão pré-teste. Vinte quatro horas após a primeira exposição, cada animal foi submetido a sessão teste por um período de 5 minutos e os comportamentos de natação (movimentos horizontais ativos, geralmente em torno de todo cilindro), escalada (movimentos de esforço para sair do cilindro com as patas dianteiras contra as paredes durante o teste) e tempo de imobilidade (posição vertical sem esforço e fazendo apenas pequenos movimentos para manter suas cabeças acima da água) são analisados (Maciel et al., 2018).

## **3.3 Coleta de amostras**

Após os testes comportamentais com os respectivos grupos experimentais, os animais foram eutanasiados por decapitação com guilhotina e, em seguida, foram coletados o sangue, medula óssea femural e estruturas encefálicas como córtex total, córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo. Após a coleta, as amostras de sangue

foram imediatamente centrifugadas a 5000 rpm utilizando a temperatura de 4°C durante 10 min. O plasma foi mantido na temperatura de -80°C, os linfócitos foram logo utilizados e as estruturas encefálicas foram armazenadas em nitrogênio líquido até análise. Todas as análises que foram investigadas estão de acordo com a metodologia específica que será posteriormente descrita, onde foram utilizados 14 animais para imunofluorescência (4 amostras de animais controle, 5 amostras de animais tipo-depressivo e 5 animais tipo-resiliente) e 14 animais (4 amostras de animais controle, 5 amostras de animais tipo-depressivo e 5 animais tipo-resiliente) para técnicas de dano e reparo de DNA, metilação de histonas e de expressão gênica.

### **3.4 Análise de dano e reparo ao DNA**

#### **3.4.1 Micronúcleos**

O ensaio de micronúcleo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Horta e colaboradores (2016). Foi realizada a extração de medula óssea femural e preparados dois esfregaços em lâminas por animal, com uma gota de soro fetal bovino. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa 10% durante 5 minutos e colocadas para secar a temperatura ambiente. Para evitar resultados falso-positivos, as lâminas foram marcadas com códigos e em seguida, foi realizada a contagem de micronúcleos utilizando microscópio óptico. Para análise, levou-se em consideração a quantidade de eritrócitos policromáticos / eritrócitos normocromáticos (PCE / NCE).

#### **3.4.2 Sensibilidade do DNA à DNase**

Amostras de córtex pré-frontal foram lisadas utilizando tampão hipotônico (NaCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5mM, Tris HCl 5mM e *protease Inhibitor cocktails*® (Thermo Fisher Scientific, EUA)) (pH=7,0). Em seguida, foi realizada a centrifugação

na velocidade de 1000×g durante 10 min a 4°C. O precipitado foi coletado e ressuspensão em tampão (NaCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, Tris HCl 10mM e *protease Inhibitor cocktails*® (Thermo Fisher Scientific, EUA)) (pH=7,0). Em seguida as amostras foram quantificadas por espectrofotometria utilizando o equipamento *SpectraMax i3 Multi-Mode Platform*® (Molecular Devices, EUA) com o comprimento de onda de 260 nanômetros (nm). Após as amostras foram tratadas com DNase tipo I® (Thermo Fisher Scientific, EUA), inativadas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02M pertencente ao kit e quantificadas por espectrofotometria novamente.

### **3.4.3 Reparo de DNA**

Para a avaliação da suscetibilidade a danos exógenos ao DNA, as células sanguíneas foram tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80µM durante 10 min) e depois incubadas por até 30 min a 37 ° C. A análise foi realizada no tempo 0' (sem adição sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e em diferentes tempos. O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado em intervalos de 30 minutos (t30', t90' e t150') e logo após, as amostras foram coletadas para análise de dano de DNA pelo método do ensaio cometa de quebras de DNA. A porcentagem de dano residual ao DNA após 2h30min (t150') de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi calculada usando o valor de t30'.

## **3.5 Análise de metilação em histonas**

### **3.5.1 Extração de histonas**

Para a realização da extração, nos baseamos no protocolo de Shechter et al., 2007. Resumidamente, as estruturas encefálicas (córtex total, hipocampo e hipotálamo) foram fatiadas e maceradas utilizando um tampão de lise hipotônico (sacarose 50mM, Tris HCl 50mM, KCl 25mM e *protease Inhibitor cocktails*® (Thermo

Fisher Scientific, EUA)) (pH=7,0). Posterior a isso, centrifugamos o material lisado a 7600 xg durante 1 min na temperatura de 4°C. Após ressuspendemos o *pellet* com HCl 0,2N e incubamos no gelo durante 1h, dando sucessivos vórtex a cada 10 min. Logo após, centrifugamos a 16000 xg durante 1 min na temperatura de 4°C, retiramos o sobrenadante e adicionamos TCA 50%. Após, houve a centrifugação durante 15 minutos na velocidade de 16.000xg na temperatura de 4°C, retiramos o sobrenadante e lavamos o *pellet* com acetona 100%. Em seguida, retiramos o sobrenadante e deixamos o *pellet* secar durante 15 minutos para a acetona evaporar. Por fim, ressuspendemos o *pellet* com um solução contendo TrisCl 50mM/ SDS 3%.

A concentração de proteínas foi mensurada pelo método de BCA (Serva, Germany), seguindo as instruções do fabricante e logo após, ponderadas para a mesma concentração. O conteúdo extraído foi então armazenado a -20 °C

### **3.5.2 Western blot**

A técnica de *Western Blot* foi realizada conforme (Sadakierska-Chudy et al., 2017), utilizando 10µg de proteínas de cada amostra na presença de uma solução de tampão de amostra Laemmly 5X. A fim de verificar o imunoc conteúdo, foi realizado o SDS-PAGE 15%, utilizando o Mini PROTEAN Tetra System® (Bio-Rad, EUA) na voltagem de 200v. Após as proteínas serem separadas gel de poliacrilamida, realizou-se a transferência para uma membrana de baixa fluorescência de PVDF 0,2µm (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizando o mesmo sistema. Após essa sequência de eventos, as membranas foram bloqueadas com albumina (BSA) 5% dissolvidas em tampão Tris contendo 0.1% de tween-20 (TTBS 0.1%). Em seguida, as membranas foram incubadas “*overnight*” com o anticorpo primário (H3; H3K4me3; H3K9me3; H3K27me3; H3K36me3 e H3K79me3) provenientes de kit comercial *Tri-Methyl*

*Histone H3 Antibody*® (Cell Signaling Technology, EUA). Passado o período de incubação com o anticorpo primário, a incubação com o anticorpo secundário foi realizada com IgG *anti-rabbit* durante 2h em temperatura ambiente. Tanto a incubação com o anticorpo primário, quanto com o secundário foram seguidas de 4 lavagens com TTBS 0.1% sob agitação. A seguir, as membranas foram preparadas e reveladas em um fotodocumentador. Posteriormente, os resultados foram quantificados utilizando o *software ImageJ*® e a detecção foi normalizada utilizando a proteína  $\beta$ -actina.

### **3.6 Análise da expressão gênica**

#### **3.6.1 Extração de RNA**

Resumidamente, foi utilizado de 50 a 100g do tecido das estruturas como o córtex e hipocampo, os quais foram macerados utilizando o reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, EUA) para a lise celular. Posteriormente, o material lisado foi incubado e centrifugado a 12.200 rpm durante 15 minutos a 4°C com o reagente clorofórmio (Merck, Millipore, EUA) para o isolamento do RNA. O RNA isolado foi incubado com isopropanol (Merck, Millipore, EUA) e precipitado por centrifugação a 12.200 rpm durante 10 min a 4°C para posterior lavagem. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% (Merck, Millipore, EUA) e centrifugado durante 5 min durante 9.700 rpm a 4°C. Em seguida, os tubos foram abertos na capela de exaustão para evaporar o etanol e futura eluição de *pellet* de RNA com H<sub>2</sub>O DEPC® (Thermo Fisher Scientific, EUA). O RNA extraído foi armazenado no freezer -80°C até sua utilização.

### 3.6.2 Confeção de DNA complementar (cDNA)

Ao iniciar o processo, as amostras de RNA extraídas a partir dos tecidos foram quantificadas através do método de espectrofotometria, com o auxílio do equipamento SpectraMax i3 Multi-Mode Platform® (Molecular Devices, EUA) utilizando absorvância no comprimento de onda de 260nm. Já a pureza das amostras foi avaliada por meio da razão entre as absorvâncias obtidas em 260nm e 280nm (razão A260/A280).

Para a reação de síntese de cDNA, foi utilizado 2 µg de RNA, o qual foi convertido em cDNA utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Thermo Fischer Scientific, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.6.3 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o kit *PowerUp™ SYBR® Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os genes amplificados com seus respectivas sequências foram: RELN (5' AACTACAGCGGGTGGAAACC 3' e 3' ATTTGAGGCATGACGGACCTATAT 5'), GLT-1 (5' AGTATGTGGCGGGCTGCTTCG 3' e 3' GGAAATAATGAGAGGGAGGAT 5'), GLAST (5' AACTTTGCCTGTTACCTTC 3' e 3' CAGTCACAATCTGACCTCC 5'), GS (5' TCCTGTGGCCATGTTTCGAG 3' e 3' GCGGGCTTCCGGTTATACTTG 5'), GFAP (5' TGACGCCTCCACTCCCTGCC 3' e 3' CATCTCCGCACGCTCGCTGG 5') e β-actina (5' TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCT 3' e 3' GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA 5'). Posterior amplificação, os resultados foram calculados pelo método  $2^{-\Delta\Delta ct}$ .

### 3.7 Imunofluorescência

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina (intraperitonealmente), e perfundidos pelo coração utilizando solução salina 0,9%, seguida de solução de paraformaldeído (PFA) 4% em PBS 100 mM (pH 7,4). Posteriormente, os cérebros foram dissecados e mantidos em PFA 4% por 24h a 4°C e em seguida foram crioprotetidos em solução sacarose 30% em PBS a 4°C. Após a crioproteção, os cérebros foram congelados em isopentano e seccionados em fatias de 30 µm no plano coronal utilizando criostato Microm HM 525 (Thermo Scientific, EUA) a -25°C. Especificamente, foram seccionadas fatias de estruturas como córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo, as quais permaneceram em solução PBS 100 mM acrescido de azida sódica (0,5%) até a realização do ensaio de imunofluorescência via sistema free-floating. No ensaio de imunofluorescência, as fatias foram primeiramente lavadas três vezes com PBS 100 mM, e bloqueadas usando soro de cavalo 5% diluído em PBS 100 mM contendo 2% de Triton x100 (PBS-Tx) por duas horas a temperatura ambiente. Na sequência, os tecidos foram incubados por 72 horas a 4°C com o anticorpo primário camundongo anti-GFAP (Sigma, 1:400) em PBS. Após três lavagens com PBS 100 mM, os tecidos foram incubados com o anticorpo secundário anti-camundongo Alexa 488 (Invitrogen, 1:400) em PBS-Tx por duas horas a temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, os tecidos foram lavados outras três vezes com PBS e então incubadas com DAPI (Sigma, 1:1000) por cinco minutos. Após etapas de lavagens com PBS, as lamínas foram confeccionadas com líquido CC/Mount e cobertas com lamínulas. Por fim, as imagens do córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo foram adquiridas com um Microscópio EVOS®FL Auto Imaging System (AMAFD1000 – Thermo Fischer Scientific; MA, USA) (de Oliveira et al., 2014).

### **3.8 Análise estatística**

Os resultados de imunoconteúdo das trimetilações da H3, expressão gênica, campo aberto e reconhecimento de objetos foram analisadas utilizando Análise de Variância (ANOVA) bidirecional, seguido do teste *post hoc* de *Tukey*, exceto o consumo de sacarose, labirinto em Y, nado forçado e *splash test*, que foram analisados utilizando ANOVA unidirecional seguido pelo mesmo teste *post hoc*.

## 4. Resultados

### 4.1 Testes comportamentais

Foram realizados 5 testes comportamentais em sequência a fim de verificar o padrão comportamental de cada animal dos grupos experimentais (animais controles e animais submetidos ao ECMI). Destaca-se que a avaliação de todos os comportamentos em conjunto foi utilizada para designar os animais submetidos ao ECMI que desenvolveram o comportamento tipo-depressivo ou demonstraram resiliência ao protocolo utilizado.

Conforme explicado na seção 3.2.1, o teste de consumo de sacarose foi realizado semanalmente. Nossos resultados demonstram que o *Baseline* de todos os grupos são iguais ( $p=0,998$ , dados não mostrados). Entretanto, uma diminuição significativa ( $p=0,016$ ) no consumo de sacarose 1.5% nos animais tipo-depressivo é observada a partir da 4ª semana do protocolo do ECMI (figura 6, painel C). Os animais do grupo controle, assim como os animais considerados resilientes demonstraram um consumo de sacarose semelhante durante todas as semanas analisadas (figura 6, painel A e B, respectivamente).

Considerando que o consumo de sacarose é o comportamento mais utilizado em estudos utilizando o ECMI, utilizamos esta análise comportamental para estabelecermos os grupos resilientes e depressivos. Contudo, na tentativa de melhor caracterizar e nos cercar de eventuais resultados falso positivo/negativo, outros testes comportamentais foram realizados a fim de melhor caracterizar o fenótipo de cada animal.

A fim de investigar a atividade locomotora e memória de habituação foram realizadas duas sessões de campo aberto. Dessa maneira, foi possível observar que

o grupo tipo-depressivo apresentou uma locomoção significativamente menor em comparação com o grupo controle ( $p=0,016$ ). Ademais, observamos que os grupos controle e resilientes apresentam uma diminuição significativa na locomoção quando comparamos a sessão 1 com a sessão 2 do campo aberto ( $p=0,049$ ,  $p=0,045$  respectivamente), enquanto os animais do grupo tipo-depressivo não demonstraram nenhuma alteração na atividade locomotora comparando ambas sessões do campo aberto (figura 7). A taxa de similaridade entre o consumo de sacarose com o campo aberto foi 80% (8 animais apresentaram comportamento tipo-depressivo nesse teste também).

Posteriormente, os animais foram submetidos ao teste comportamental de reconhecimento de objetos, com o objetivo de verificar a taxa memória de reconhecimento. Na sessão de treino do RO é possível observar que todos os grupos exploraram de maneira semelhante os 2 objetos. Na sessão de teste, 24h após, observamos um aumento significativo nos animais controle ( $p=0,007$ ), assim como nos com comportamento dos animais resilientes ( $p=0,001$ ) comparando a exploração do FO com o NO. Em contrapartida, animais do grupo tipo-depressivo, apresentaram uma similaridade na exploração do FO e NO ( $p=0,401$ ), conforme demonstrado na figura 8. A taxa de similaridade entre o consumo de sacarose com o RO foi de 90%

Após, foi realizado o teste de Labirinto em Y e podemos observar que tanto os animais que apresentavam até o momento o comportamento tipo-depressivo ( $p=0,090$  e tipo-resiliente ( $p=0,126$ ) não houve um indicativo que déficit cognitivo, uma vez que estes animais exploraram de maneira igual os braços do labirinto em relação ao controle.

No *splash test*, o quinto paradigma comportamental investigado, observamos que o controle não difere estatisticamente quando comparado com os animais resilientes ( $p=0,657$ ) e tipo-depressivo ( $p=0,275$ ).

Por fim, realizamos o teste do nado forçado. Observamos que tanto os animais controles quanto os animais submetidos ao ECMI, obtiveram o tempo de natação semelhantes (resilientes ( $p=0,992$ ), tipo-depressivos ( $p=0,723$ )), uma vez que tiveram o tempo de imobilidade reduzido.

Após minuciosa análise comportamental, foi possível observar que os testes de campo aberto e reconhecimento de objetos reproduzem com grande fidelidade os achados do consumo de sacarose, permitindo com isso, aumentar sensibilidade para inferir os animais que são resilientes ao ECMI e quais desenvolvem o fenótipo do tipo-depressivo.

## **4.2 Dano e Reparo ao DNA**

A fim de verificar um possível dano permanente ao DNA, foi realizado o teste de micronúcleos. Observamos que não há dano permanente nos animais que foram submetidos ao ECMI ( $p=0,641$ ) em relação aos animais controles (figura 9).

Em seguida, verificamos se haveria reparo no dano ao DNA, uma vez que não se mostrava ser permanente. A partir dos nossos resultados, notamos que há a potencialização do dano em todos os grupos experimentais ( $p<0,0001$ ) no tempo de 30 minutos com  $H_2O_2$ , mas a partir desse tempo o dano começa a ser reparado também em todos grupos experimentais. No tempo de 90 minutos verificamos que os animais tipo-depressivos ainda possuem um dano elevado ( $p<0,0001$ ) enquanto os animais resilientes e controles possuem uma elevada taxa de reparo do dano ( $p=0,069$ ,  $p=0,062$ , respectivamente). Entretanto, percebemos que o dano tanto no

grupo resiliente quanto controle no tempo de 150 minutos foi reparado próximo ao nível basal ( $p=0,239$ ,  $p=0,948$ , respectivamente), enquanto o dano do grupo tipo-depressivo foi reparado ( $p=0,811$ ), porém, de maneira mais lenta em comparação com os outros grupos experimentais, conforme demonstrado na figura 10.

Em relação a sensibilidade do DNA à DNase, podemos verificar que não há alteração em relação ao remodelamento da cromatina, uma vez que não houve diferença estatística dos animais submetidos ao ECMI (resilientes  $p=0,877$  e tipo-depressivo  $p=0,977$ ) em relação aos animais controles (figura 11).

### **4.3 Modificações epigenéticas**

A partir da análise do imunocontéudo possuindo resíduos trimetilados da H3 e H3 total do hipotálamo, nós constatamos que os animais com fenótipo resiliente ( $p=0,002$ ) e controles ( $p=0,0009$ ) possuíam maior imunocontéudo de H3 total quando comparados com os animais tipo-depressivo. Já em relação a H3K27me3, os animais caracterizados como tipo-depressivo possuem hipermetilação ( $p=0,024$ ) desse resíduo quando comparados com os controles. Além disso, animais com o fenótipo tipo-depressivo dispõem da H3K9me3 hipometilado no hipotálamo em comparação com animais com fenótipo de resiliência e controles ( $p=0,441$  e  $p=0,046$ , respectivamente) (figura 13). Em relação a H3K4me3 não encontramos diferença do grupo controle em relação aos animais resilientes ( $p=0,908$ ) e tipo-depressivo ( $p=0,701$ ), bem como H3K36me3 ( $p=0,080$  e  $p=0,922$ , respectivamente) e H3K79me3 ( $p=0,878$  e  $p=0,642$ , respectivamente), demonstrando que o padrão de metilação nesses resíduos não foram modificados com o ECMI, conforme demonstrado na figura 12.

Ao contrário do hipotálamo, quando analisamos o hipocampo observamos que há diferença estatística nas metilações de caráter favorável a expressão gênica. A modificação H3K4me3 encontra-se hipermetilada nos animais resilientes em relação aos animais controles e tipo-depressivo ( $p=0,044$  e  $p=0,039$ , respectivamente). O mesmo verificamos com a modificação H3K36me3, essa modificação mostrou estar hipermetiladas no grupo com fenótipo tipo-resiliente em relação aos outros grupos experimentais (grupo controle  $p=0,002$  e tipo-depressivo  $p=0,035$ ). Já em relação às metilações de repressão da expressão gênica, podemos verificar que houve diferença estatística na H3K9me3, a qual está hipermetilada nos animais com fenótipo tipo-depressivo ( $p=0,0002$ ) e de resiliência ( $p=0,0001$ ), em comparação ao controle. Não foram observadas diferenças estatísticas na H3 total entre o grupo controle em relação aos animais resilientes ( $p=0,340$ ) e tipo-depressivo ( $p=0,642$ ), o mesmo observamos em relação a H3K27me3 ( $p=0,0471$  e  $p=0,987$ , respectivamente) e H3K79me3 ( $p=0,958$  e  $p=0,999$ , respectivamente), conforme observado na figura 13.

Quando analisamos as trimetilações no córtex total, não observamos nenhuma alteração significativa em relação ao padrão de metilação das modificações H3K4me3 ( $p=0,848$ ), H3K9me3 ( $p=0,555$ ), H3K27me3 ( $p=0,791$ ), H3K36me3 ( $p=0,610$ ), H3K79me3 ( $p=0,298$ ), bem como a H3 total ( $p=0,060$ ), conforme mostra a figura 14.

#### **4.4 Expressão gênica**

Analisamos genes que estão envolvidos com a regulação de glutamato (GLT-1 e GLAST), gene que codifica para a enzima que está relacionada com a síntese de Gln (GS), proteína que está relacionada com migração neuronal (RELN) e proteína fibrilar ácida (GFAP) presentes em células gliais.

A partir dos nossos resultados, observamos que no hipocampo houve o aumento da expressão do gene que codifica para o GLT-1 nos animais tipo-depressivos ( $p=0,042$ ) quando comparados com o controle. No entanto, no GLAST observamos a redução da expressão do gene que codifica para o mesmo nos animais com o fenótipo tipo-depressivo ( $p=0,001$ ) em relação aos animais controle. Ainda, vimos que há a redução da expressão do gene que codifica para a GS também nos animais tipo-depressivo ( $p=0,044$ ). Não observamos diferença significativa na expressão dos genes RELN nos animais resilientes ( $p=0,824$ ) e com o fenótipo tipo-depressivo ( $p=0,977$ ) em relação ao controle. Observamos o mesmo resultado referente ao GFAP ( $p=0,992$  e  $p=0,812$ , respectivamente), conforme demonstrado na figura 15.

Quando avaliamos o córtex total, verificamos que há um aumento da expressão do gene que codifica para a RELN nos animais com fenótipo resiliente ( $p=0,026$ ) em relação ao controle. Além disso, ainda, observamos o aumento da expressão do gene que codifica para a GS nos animais tipo-depressivo ( $p=0,034$ ) e redução da expressão do gene que codifica para GLAST nos animais com fenótipo tipo-depressivo ( $p=0,004$ ) em relação ao controle (figura 16). Não observamos diferenças estatísticas em relação ao gene GFAP nos animais resilientes ( $p=0,353$ ) e tipo-depressivo ( $p=0,333$ ) em relação ao grupo controle. O mesmo verificamos em relação ao gene GLT-1 ( $p=0,634$  e  $p=0,421$ , respectivamente).

#### **4.5 Imunofluorescência**

Com o intuito de avaliar a astrogliose no córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo realizou-se a análise do da proteína GFAP por meio de imunofluorescência. Os animais com fenótipo tipo-depressivo apresentaram uma

maior imunorreatividade para GFAP no hipocampo, representado pela região CA3 em relação aos demais grupos experimentais (figura 17). Além disso, os animais tipo-resilientes apresentam maior imunoconteúdo de GFAP no hipotálamo. Já no córtex pré-frontal os animais apresentaram uma redução da imunorreatividade para GFAP em relação aos grupos controle e depressivo.

## Parte III

## 5. Discussão

O TDM é uma patologia multifatorial onde fatores externos acabam influenciando a sua fisiopatologia. Demonstramos pela primeira vez que a H3K9me3 e H3K27me3 podem estar envolvidas com a regulação de glutamato na TDM utilizando o ECMI. Além disso, temos como hipótese que a H3K4me3 e H3K36me3 podem estar envolvidas com a neurogênese, uma vez que estas modificações estão envolvidas com a proliferação e diferenciação celular e a RELN com migração neuronal (Nakajima et al., 2020).

Embora seja possível encontrarmos na literatura diferentes modelos animais para o estudo da TDM, o modelo de ECMI é considerado um dos modelos com maior validade etiológica, de face, predição e de constructo tornando-o uma importante ferramenta para estudos pré-clínicos com alto potencial translacional. A grande crítica sofrida por este modelo, considera principalmente os aspectos relacionados com a reprodutibilidade (Machado-Vieira et al., 2008), visto a diferente proporção obtida de animais resilientes e com comportamento do tipo-depressivo comparando diferentes levadas submetidas ao mesmo protocolo do ECMI. Considerando este aspecto, nosso objetivo inicial foi submeter os animais a diferentes paradigmas comportamentais que torne possível avaliarmos não apenas a anedonia (através do consumo de sacarose), mas sim outros fenótipos importantes presentes na TDM, como por exemplo: retardo psicomotor (campo aberto), déficit cognitivo (memória de habituação no campo aberto), memória de reconhecimento no (RO), autocuidado (*splash test*) e habituação com uma situação inóspita (nado forçado).

Diante disso, nossos resultados demonstram que a classificação dos diferentes animais submetidos aos diferentes paradigmas comportamentais possuem uma similaridade média de 90%. Neste sentido, antes de fazermos as análises bioquímicas

propostas no estudo, buscamos aprimorar as análises do fenótipo dos animais, diminuindo, dessa maneira, falsos positivos ou negativos e conseqüentemente aumentando a reprodutibilidade e confiança do modelo do ECMI.

Mesmo utilizando essa abordagem mais com maior precisão é possível observarmos que nossos resultados vão de encontro a muitos estudos presentes na literatura científica, como por exemplo dados de Liu e colaboradores (2017), onde foi observado que animais submetidos ao estresse por derrota social e por ECMI reduziram seu consumo de sacarose. Son e colaboradores (2019) obtiveram o mesmo resultado quando submeteram animais ao estresse de restrição. Ainda, observamos o mesmo resultado quando animais são induzidos ao TDM por inflamação sistêmica utilizando LPS (Couch et al., 2016).

Couch e colaboradores (2016) ainda verificaram redução da distância percorrida no campo aberto. Dang e colaboradores (2019) observaram diminuição do comportamento exploratório dos animais induzidos ao fenótipo tipo-depressivo por LPS e Li e colaboradores (2018) quando os animais foram expostos ao ECMI, corroborando com nossos resultados.

Wang e colaboradores (2018) não verificaram diferença entre o tempo de *grooming* (corresponde ao nível de autocuidado) nos animais com TDM induzidos por ECMI. Já nossos resultados vão ao desencontro ao dos autores (Kun et al., 2018; Lapmanee et al., 2017). Com 42 dias de ECMI conseguimos verificar que os animais com fenótipo tipo-depressivo possuem o nível de auto-cuidado reduzido em relação aos outros grupos experimentais.

Curiosamente, alguns autores não observaram um elevado tempo de imobilidade utilizando o nado forçado (Couch et al., 2016), indo ao encontro com nossos resultados. Isso pode ser explicado uma vez que este teste possui uma carga

estressante para o animal e nossos animais foram expostos a vários estresses com duração de 6 semanas. Nossos animais podem ter se adequado facilmente à situação estressora do nado forçado. Esse teste é clássico para verificar o fenótipo tipo-depressivo e efetividade de fármacos em reverter o fenótipo (Yankelevitch-Yahav et al., 2015).

Os resultados dos autores demonstram que dependendo do modelo há uma variação entre o desempenho dos animais em determinados testes comportamentais. Entretanto, nossos resultados corroboraram com a literatura, uma vez que demonstramos que nossos animais possuíam anedonia, redução da atividade locomotora e exploratória e déficit cognitivo. Características estas que são fiéis ao comportamento tipo-depressivo.

O elevado tempo de ECMI pode resultar em inflamação derivada de altos níveis de glicocorticoides. Evidências indicam que a inflamação causa um aumento de estresse oxidativo, podendo desempenhar um papel fundamental na patogênese do TDM. Além disso, pacientes depressivos possuem elevação da peroxidação lipídica e produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem danificar biomoléculas como o DNA (Ahmadimanesh et al., 2019; Alcocer-Gómez et al., 2014; Czarny et al., 2018; Pasco et al., 2010; Rodrigues, Peterson & Perry, 2014). Resultados da literatura demonstram que animais submetidos a diferentes situações de estresse, agudo ou crônico aumentam a probabilidade de dano ao DNA (Jorgensen et al., 2019), e que células mononucleares de sangue advindas de pacientes depressivos também possuem maior dano ao DNA (Czarny et al., 2015). Entretanto, nossos achados demonstram um efeito mais sutil promovido pelo estresse a nível de DNA. A partir do ensaio de micronúcleos podemos verificar que não houve dano permanente ao DNA e quando desafiamos linfócitos a 80mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificamos que

após 30 minutos houve o reparo do DNA nos animais com fenótipo resiliente e controle, onde no tempo de 150', sua porcentagem de dano chegou próximo ao tempo 0'. Já nos animais com o fenótipo tipo-depressivo observamos que o reparo acontece de maneira mais lenta e ineficiente. Já é demonstrado que genes envolvidos com o reparo de DNA podem ser afetados por SNP's, o que pode prejudicar a atividade de enzimas envolvidas com este parâmetro. Portanto, a menor eficiência da taxa de reparo pode ser atribuída parcialmente para mutações, bem como a gravidade da patologia (Czarny et al., 2016 Lindqvist et al., 2016; Zielinska et al., 2011). Outro indicador confiável ao dano a nível de DNA é o remodelamento da cromatina, um parâmetro mediador de alterações neurais duradouras em respostas ao estresse (Covington et al., 2011). A partir dos nossos resultados verificamos que não houve remodelamento da cromatina dos animais que foram expostos ao ECMI em relação ao controle. Os resultados que demonstram este dano são modelos mais agressivos de estresse ou em estudos clínicos. Isso pode justificar as diferenças, no nosso caso, é um modelo de estresse moderado, e com relação a clínica poderíamos dizer que os pacientes estão expostos a outras variáveis que podem interferir nesse parâmetro.

O DNA é armazenado em uma estrutura altamente organizada, a cromatina, cuja ela controla processos celulares que envolvem o DNA, como a transcrição, replicação e reparo. Observamos que os animais tipo-depressivo possuem imunoconteúdo de H3 total reduzido quando comparado com os outros grupos experimentais. A H3 está relacionada com reparo de DNA, uma vez que sua variante H3.3 é constitutivamente expressa durante todos estágios do ciclo celular, devido a isso, está presente em locais de dano para facilitar a progressão da transcrição e replicação após reparo (Adam, Polo & Almouzni, 2013; Frey et al., 2014).

Embora diversos estudos tenham examinado o impacto do ambiente em perfis neurais, pouco se sabe sobre modificações relacionadas a epigenética. As modificações epigenéticas, estão sendo evidenciadas como um dos mecanismos fundamentais para a regulação da expressão gênica. A partir dos anos 2000, essas modificações iniciaram a receber grande atenção no estudo da depressão. Muitos estudos sugerem que a regulação a longo prazo da expressão gênica através de mecanismos epigenéticos podem mediar alterações permanentes no cérebro, que pode beneficiar ou prejudicar sua função e contribuir para a patogênese dos transtornos psiquiátricos.

As trimetilações K4, K9, K27, K36 e K79 da H3 estão ganhando espaço na área do TDM devido às funções que elas contribuem para alterar a expressão de genes quando ligam-se a promotores gênicos. Lembro que cada modificação na lisina específica resultará em diferentes alterações da expressão gênica.

Pathak e colaboradores (2017) demonstraram que há uma desregulação de KDM's e KMT's após estresse crônico em camundongos. Além disso, animais que foram expostos a estresse por derrota social durante 10 dias tiveram seus níveis de H3K9me3 e H3K36me3 aumentados no núcleo accumbens (uma região crítica da via de recompensa envolvida no desenvolvimento da anedonia) inclusive nos animais resilientes, porém, quando os animais são expostos ao mesmo estresse por um menor período (5 dias) não foi observado o mesmo aumento. Nossos resultados demonstram que com estresse crônico (42 dias) há a redução do padrão de metilação na K9me3 no hipotálamo dos animais tipo-depressivo e a hipermetilação desse resíduo no hipocampo dos animais submetidos ao ECMI. Além disso, não há o aumento do imunoconteúdo de K36me3 no hipotálamo dos animais com fenótipo resiliente, corroborando em parte com a literatura. A H3K9me3 está intimamente relacionada

com o circuito de recompensa, que por sua vez é alterado em ratos submetidos ao modelo experimental do ECMI, estando de acordo com os resultados que foram encontrados nesse trabalho. Ainda, verificou-se em animais induzidos à depressão e em cérebro post-mortem de pacientes depressivos um nível elevado da H3K9me2, sugerindo que esta alteração possa estar envolvida com a patologia da doença (Covington et al., 2011). Com relação à H3K36me3 mais estudos são necessários para melhor elucidar seu papel, no entanto, sabemos que ela está relacionada com a proliferação e diferenciação celular. Nossos resultados demonstram que os animais com fenótipo resiliente possuem o padrão elevado dessa modificação no hipocampo, quando comparado com os demais grupos. Resultados da literatura demonstram que quando há a diminuição desta modificação compromete a transição das fases G1-S e G2 do ciclo celular (Brien et al., 2012; Wei et al., 2017 Zhao et al., 2010). Desta maneira, surgiu a hipótese que esta modificação poderia estar relacionada com a neurogênese e possível neurodiferenciação, o que poderia contribuir para a resiliência dos animais, porém, o envolvimento da H3K36me3 nesses mecanismos ainda não foi elucidado na literatura.

A hipótese da H3K4me3 e H3K36me3 estarem relacionadas com a neurogênese partiu dos nossos achados onde observamos que no hipocampo dos animais resilientes havia a hipermetilação dessas duas modificações em comparação com os animais controles e tipo-depressivo. Ambas as metilações estão envolvidas com a plasticidade sináptica, e regulam genes pertencentes a família de sinaptofisinas, principalmente a SYN1, SYN2 e SYN3 (Cruceanu et al., 2013).

Até o momento, no nosso conhecimento, a trimetilação na K27 possui a melhor fundamentação do seu envolvimento com o sistema glutamatérgico. Essa modificação está envolvida com a liberação de glutamato e sabe-se que ela interage com o

promotor do gene *Grm2* que regula a expressão do receptor mGlu2 no hipocampo (Nasca et al., 2016). Nossos resultados demonstram que o resíduo K27 está hipermetilado no hipotálamo dos animais com o fenótipo tipo-depressivo em comparação com os demais grupos. Quando avaliamos os transportadores de glutamato astrocitários como o GLT-1 e GLAST observamos que os animais expostos ao ECMI possuem aumento da expressão do gene que codifica para GLT-1 no hipocampo, ao contrário do córtex total. Entretanto, quando avaliamos a expressão do gene que codifica para GLAST verificamos a redução de sua expressão no córtex total e hipocampo, abrindo espaço para hipotetizar que H3K27me3 possa interagir com o promotor gênico de GLAST, uma vez que esta modificação favorecem a redução da expressão gênica. Quando avaliamos o gene que codifica para GS, observamos que sua expressão está reduzida no hipocampo dos animais com fenótipo tipo-depressivo. Porém, quando avaliamos sua expressão no córtex total verificamos que há o aumento da sua expressão nos animais com fenótipo tipo-depressivo em relação aos outros grupos experimentais. Shirayama et al., 2017 verificou que o córtex de pacientes com TDM havia menor concentração de glutamato, glutamina e mio-inositol. Com isso, a alta expressão de GS nos nossos animais com o fenótipo tipo-depressivo estaria indicando que há uma baixa concentração de glutamato no córtex e a GS estaria tentando suprir a necessidade de glutamina, onde a sua falta possivelmente estaria prejudicando a sinapse glutamatérgica e homeostase cerebral. No TDM há evidências que apontam para a preservação de neurônios e a maioria dos estudos post-mortem não observaram reduções na densidade neuronal ou número total de neurônios. Visto que o GLT-1 está presente também em neurônios, podendo ser uma explicação para seu aumento de expressão (Hercher et al., 2010; Khundakar et al., 2011; Yildiz-Yesiloglu & Ankerst, 2006).

Foi descoberto que a H3K9me3 está inversamente correlacionada com a expressão dos genes CX (conexina) em astrócitos e esse aumento de metilação diminui a expressão desses genes que formam a base dos canais de junção gap, permitindo a regulação de funções metabólicas e homeostáticas (Corina et al., 2017; Pannasch & Rouach, 2013). O desequilíbrio da homeostase glutamatérgica já é elucidado e relacionado com a depressão. Sabe-se que os efeitos do estresse em regiões como o córtex, hipocampo e hipotálamo envolvem a ação de glutamato e que estresse de maneira aguda aumenta a plasticidade sináptica, melhora a cognição e funções adaptativas, enquanto no estresse crônico acontece o contrário, inclusive supressão de neurogênese (Mcewen, 2010; Nasca et al., 2015; Popoli et al., 2011). Nasca e colaboradores (2015) demonstraram que quando há atividade reduzida de mGlu2 (autorreceptor), levaria a um aumento da atividade glutamatérgica o que resultaria na inibição da neurogênese.

Neste contexto, modificações epigenéticas constituem mecanismos moleculares que são modificados por alterações ambientais, como demonstrado neste trabalho.

Os astrócitos podem exercer efeitos benéficos ou prejudiciais de acordo com o contexto metabólico, estas células são sensíveis e reativas a estímulos ambientais (Sofroniew, 2009). Astrócitos reativos podem ter perda de funções normais e ganho de efeitos anormais que podem desencadear uma variedade de processos patológicos.

Si e colaboradores demonstraram que pacientes mais jovens possuíam a densidade e imunorreatividade de GFAP reduzida do que pacientes mais velhos (Si et al., 2004). Modelos como ECMI também verificam a redução de imunorreatividade de astrócitos no hipocampo de animais tipo-depressivo (Liu et al., 2009). Entretanto,

estes resultados não corroboram com nossos achados de mRNA de GFAP no hipocampo e córtex nos animais submetidos ao ECMI, onde foram encontradas alterações.

Já quando avaliamos GFAP por imunofluorescência verificamos que no córtex pré-frontal e hipotálamo houve aumento na densidade de astrócitos nos animais com o fenótipo resiliente em relação aos animais tipo-depressivos.

Em contrapartida, quando avaliamos o hipocampo notamos que houve aumento da densidade de astrócitos nos animais com fenótipo tipo-depressivo em relação aos outros grupos experimentais. Além disso, vimos por RT-qPCR que houve aumento da expressão do gene RELN no córtex dos animais com fenótipo tipo-resiliente.

Portanto, o aumento de GFAP no córtex pré-frontal e hipotálamo dos animais com fenótipo tipo-resiliente pode ser um mecanismo metabólico compensatório para uma possível neurogênese desencadeada por este modelo, visto que os astrócitos são essenciais para a maturação neuronal.

Fenton e colaboradores (2015) verificaram que antidepressivos evitam o déficit de RELN e por consequência, o fenótipo tipo-depressivo. Autores sugerem que a expressão desse gene possa ser influenciada por fatores epigenéticos, mas ainda não foi elucidado (Costa et al., 2002; Grayson & Guidotti, 2013). Ainda, quando os animais são submetidos ao estresse crônico foi observada uma menor neurogênese no hipocampo de animais com o fenótipo tipo-depressivo. Neste contexto, o único tecido que verificamos aumento de H3K4me3 e H3K36me3 foi no hipocampo de animais resilientes e RELN está diminuída no animais com fenótipo tipo-depressivo em relação aos animais resilientes. O GFAP está aumentado no córtex pré-frontal dos animais resilientes e o gene que codifica para RELN vai ao encontro com este aumento no

córtex. Desta maneira, a partir dos nossos resultados acreditamos que estas duas trimetilações e o gene RELN possam estar envolvidos com neurogênese, que por sua vez pode contribuir para o desenvolvimento do fenótipo resiliente. Quando os animais são submetidos ao estresse crônico foi observada uma menor neurogênese no hipocampo e há estudos que comprovam que esta proteína pode estar relacionada com a depressão (Fenton et al., 2015). Nosso trabalho demonstrou menor densidade de astrócitos nos animais resilientes e maior nos animais tipo-depressivo, tornando nossa hipótese mais possível.

A metilação da H3K79 está relacionada com alterações na meiose. Essa lisina metilada pode estar associada com a progressão da meiose, segundo Wang e colaboradores (2014). Além disso, regula padrões como diferenciação e progressão celular (Wootae, Minji & Já-Eun, 2014). A partir dos nossos resultados, demonstramos que não há diferença no padrão de trimetilação nessa lisina no córtex, hipotálamo e hipocampo dos animais submetidos ao ECMI em relação aos animais controle. Ao nosso conhecimento, ainda não há estudos relacionando esta metilação com o TDM.

## 6. Considerações finais

Nesta dissertação, foi realizado um estudo pré-clínico utilizando um modelo com alto potencial translacional (ECMI), a fim de investigar se animais com fenótipo tipo-depressivo teriam padrões de trimetilação de histonas, expressão gênica e de dano ao DNA diferentes de animais controles e tipo-resilientes. Utilizamos este modelo pois, é um modelo de mimetiza estresses semelhantes aos que nós seres humanos passamos no nosso cotidiano, que compreendem situações estressantes de maneira crônica, imprevisível e repetida. Além disso, verificamos se essas modificações poderiam estar relacionadas com o sistema glutamatérgico e neurogênese.

A partir dos nossos resultados, elucidamos que há padrões de trimetilação diferentes entre animais tipo-depressivos e tipo-resilientes, e que estes padrões podem estar relacionados com o desenvolvimento do fenótipo, uma vez que correlacionamos nossos achados com resultados bem fundamentados da literatura, que envolvem o sistema glutamatérgico, onde estes parecem corroborar com nossos achados em relação a H3K9me3 e H3K27me3. Além disso, a partir dos resultados obtidos das trimetilações H3K4me3 e H3K36me3, nossa hipótese seria que animais com fenótipo resiliente teriam aumento da neurogênese em relação aos animais tipo-depressivos. Nesse contexto, a partir dos nossos resultados, conseguimos verificar que animais resilientes possuem maior densidade de GFAP no córtex pré-frontal e no hipotálamo (por imunofluorescência) em relação aos animais tipo-depressivos.

Ressalto que, este foi o primeiro estudo com foco nessas trimetilações da H3 utilizando o modelo de ECMI.

Visando a necessidade de elucidação de parâmetros relacionados a epigenética, temos como perspectivas, verificar parâmetros específicos como neurogênese,

neuroinflamação e reatividade astrocitária em animais submetidos ao ECMI. Ainda, iremos avaliar se a diversidade de microrganismos presentes na microbiota possui influência no desenvolvimento do TDM.

Por fim, futuramente, iremos elucidar se essas modificações epigenéticas são passíveis de herança para a prole (F1) e se os padrões de trimetilação encontrados nesta dissertação são observados no sangue de pacientes acometidos pelo TDM.

## 7. Referências

© 1959 Nature Publishing Group. (1959).

A., Shafiq, C. W. N. S. S. J. R. B. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Acabchuk, R. L., Kamath, J., Salamone, J. D., & Johnson, B. T. (2017). Stress and chronic illness: The inflammatory pathway. *Social Science and Medicine*, *185*, 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2017.04.039>

Adam, S., Polo, S. E., & Almouzni, G. (2013). XTranscription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA. *Cell*, *155*(1), 94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.029>

Ahmad, A., Rasheed, N., Banu, N., & Palit, G. (2010). Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress*, *13*(4), 355–364. <https://doi.org/10.3109/10253891003667862>

Ahmadimanesh, M., Abbaszadegan, M. R., Morshedi Rad, D., Moallem, S. A., Mohammadpour, A. H., Ghahremani, M. H., ... Etemad, L. (2019). Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on DNA damage in patients with depression. *Journal of Psychopharmacology*, *33*(11), 1364–1376. <https://doi.org/10.1177/0269881119874461>

Ahn, A. C., Tewari, M., Poon, C. S., & Phillips, R. S. (2006). The limits of reductionism in medicine: Could systems biology offer an alternative? *PLoS Medicine*, *3*(6), 0709–0713. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030208>

Alcocer-Gómez, E., de Miguel, M., Casas-Barquero, N., Núñez-Vasco, J., Sánchez-

Alcazar, J. A., Fernández-Rodríguez, A., & Cordero, M. D. (2014). NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, *36*, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.10.017>

Allis, C. D., Berger, S. L., Cote, J., Dent, S., Jenuwien, T., Kouzarides, T., ... Zhang, Y. (2007). New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes. *Cell*, *131*(4), 633–636. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.039>

Almeida, R. F. de, Ganzella, M., Machado, D. G., Loureiro, S. O., Leffa, D., Quincozes-Santos, A., ... Souza, D. O. (2017). Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long-lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *76*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.02.013>

Antoniuk, S., Bijata, M., Ponimaskin, E., & Wlodarczyk, J. (2019). Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: Meta-analysis of model reliability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *99*, 101–116. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.002>

Arnau-Soler, A., Macdonald-Dunlop, E., Adams, M. J., Clarke, T. K., MacIntyre, D. J., Milburn, K., ... Thomson, P. A. (2019). Genome-wide by environment interaction studies of depressive symptoms and psychosocial stress in UK Biobank and Generation Scotland. *Translational Psychiatry*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0360-y>

Askim, Å., Gustad, L. T., Paulsen, J., Reitan, S. K., Mehl, A., Mohus, R. M., ... Åsvold, B. O. (2018). Anxiety and Depression Symptoms in a General Population and Future Risk of Bloodstream Infection: The HUNT Study. *Psychosomatic Medicine*, *80*(7), 673–

679. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000619>

Aston-jones, A. G., Ennis, M., Pieribone, V. A., & Nickell, W. T. (2017). *The Brain Nucleus Locus Coeruleus: Restricted Afferent Control of a Broad Efferent Network and Michael T. Shipley* Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1697940> REFERENCES Linked refer. 234(4777), 734–737.

Bank, T. W., Burden, G., The, L., Nations, U., Who, D. T., li, D. W., & Reduced, D. (1996). *World Health Organization Quality of Life Questionnaire World Health Organization World Health Organization Regions World Health Organization Disability Assessment Schedule II Xerostomia World Health Organization Quality of Life BREF Years Lived with Disa.* (Who), 4354–4355.

Benros, M. E., Waltoft, B. L., Nordentoft, M., Ostergaard, S. D., Eaton, W. W., Krogh, J., & Mortensen, P. B. (2013). Autoimmune diseases and severe infections as risk factors for mood disorders a nationwide study. *JAMA Psychiatry*, 70(8), 812–820. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.1111>

Bergström, A., Jayatissa, M. N., Mørk, A., & Wiborg, O. (2008). Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study. *Brain Research*, 1196, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.025>

Bersani, F. S., Reus, V. I., Verhoeven, J. E., & Epel, E. S. (2018). *HHS Public Access*. 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.11.031>.Oxidative

Bhutani, M. K., Bishnoi, M., & Kulkarni, S. K. (2009). Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.10.007>

Bogi, E., Belovicova, K., Csatosova, K., & Dubovicky, M. (2017). Animal models of maternal depression for monitoring neurodevelopmental changes occurring in dams and offspring. *Interdisciplinary Toxicology*, *10*(1), 35–39. <https://doi.org/10.1515/intox-2017-0005>

Bortolato, B., Miskowiak, K. W., Köhler, C. A., Maes, M., Fernandes, B. S., Berk, M., & Carvalho, A. F. (2016). Cognitive remission: A novel objective for the treatment of major depression? *BMC Medicine*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0560-3>

Bovio, P. P., Franz, H., Heidrich, S., Rauleac, T., Kilpert, F., Manke, T., & Vogel, T. (2019). Differential Methylation of H3K79 Reveals DOT1L Target Genes and Function in the Cerebellum In Vivo. *Molecular Neurobiology*, *56*(6), 4273–4287. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1377-1>

Brien, G. L., Gambero, G., O'Connell, D. J., Jerman, E., Turner, S. A., Egan, C. M., ... Bracken, A. P. (2012). Polycomb PHF19 binds H3K36me3 and recruits PRC2 and demethylase NO66 to embryonic stem cell genes during differentiation. *Nature Structural and Molecular Biology*, *19*(12), 1273–1281. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2449>

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H. L., ... Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, *301*(5631), 386–389. <https://doi.org/10.1126/science.1083968>

Chen, W. Y., Zhang, H., Gatta, E., Glover, E. J., Pandey, S. C., & Lasek, A. W. (2019). The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) alleviates depression-like behavior and normalizes epigenetic changes in the hippocampus

during ethanol withdrawal. *Alcohol*, 78, 79–87.

<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2019.02.005>

Chen, Y., Wang, H. D., Xia, X., Kung, H. F., Pan, Y., & Kong, L. D. (2007). Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the chronic mild stress model of depression in mice. *Phytomedicine*, 14(7–8), 523–529.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.09.007>

Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374–381. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>

Correction Collins, P. Y., Patel, V., Joestl, S. S., March, D., Insel, T. R., Daar, A. S., ... Walport, M. (2011). Grand challenges in global mental health. *Nature*, 475(7354), 27–30. <https://doi.org/10.1038/475027a>

Costa, E., Chen, Y., Davis, J., Dong, E., Noh, J. S., Tremolizzo, L., ... Guidotti, A. (2002). REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. *Molecular Interventions*, 2(1), 47–57. <https://doi.org/10.1124/mi.2.1.47>

Couch, Y., Trofimov, A., Markova, N., Nikolenko, V., Steinbusch, H. W., Chekhonin, V., ... Strekalova, T. (2016). Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0572-0>

Covington, H. E., Maze, I., Sun, H. S., Bomze, H. M., DeMaio, K. D., Wu, E. Y., ... Nestler, E. J. (2011). A role for repressive histone methylation in cocaine-induced vulnerability to stress. *Neuron*, 71(4), 656–670.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.007>

Cruceanu, C., Alda, M., Nagy, C., Freemantle, E., Rouleau, G. A., & Turecki, G. (2013). H3K4 tri-methylation in synapsin genes leads to different expression patterns in bipolar

disorder and major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(2), 289–299. <https://doi.org/10.1017/S1461145712000363>

Cryan, J. F., & Mombereau, C. (2004). In search of a depressed mouse: Utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry*, 9(4), 326–357. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001457>

Czarny, P., Kwiatkowski, D., Kacperska, D., Kawczyńska, D., Talarowska, M., Orzechowska, A., ... Śliwiński, T. (2015). Elevated level of DNA damage and impaired repair of oxidative DNA damage in patients with recurrent depressive disorder. *Medical Science Monitor*, 21, 412–418. <https://doi.org/10.12659/MSM.892317>

Czarny, P., Kwiatkowski, D., Toma, M., Kubiak, J., Sliwinska, A., Talarowska, M., ... Sliwinski, T. (2017). Impact of Single Nucleotide Polymorphisms of Base Excision Repair Genes on DNA Damage and Efficiency of DNA Repair in Recurrent Depression Disorder. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4150–4159. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9971-6>

Czarny, P., Wigner, P., Galecki, P., & Sliwinski, T. (2018). The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 80(February 2017), 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.06.036>

Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., & Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>

Czéh, B., Simon, M., Schmelting, B., Hiemke, C., & Fuchs, E. (2006). Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 31(8), 1616–1626.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300982>

Dang, R., Guo, Y. Y., Zhang, K., Jiang, P., & Zhao, M. G. (2019). Predictable chronic mild stress promotes recovery from LPS-induced depression. *Molecular Brain*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0463-2>

Dantzer, R., & Walker, A. K. (2014). Is there a role for glutamate-mediated excitotoxicity in inflammation-induced depression? *Journal of Neural Transmission*, *121*(8), 925–932. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1187-1>

De Oliveira, J., Moreira, E. L. G., Dos Santos, D. B., Piermartiri, T. C., Dutra, R. C., Pinton, S., ... De Bem, A. F. (2014). Increased susceptibility to amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. *Journal of Alzheimer's Disease*, *41*(1), 43–60. <https://doi.org/10.3233/JAD-132228>

Di Giovanni, G., Strac, D. S., Sole, M., Unzeta, M., Tipton, K. F., Mück-Šeler, D., ... De Deurwaerdère, P. (2016). Monoaminergic and histaminergic strategies and treatments in brain diseases. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00541>

Doernberg, E., & Hollander, E. (2016). Neurodevelopmental Disorders (ASD and ADHD): DSM-5, ICD-10, and ICD-11. *CNS Spectrums*, *21*(4), 295–299. <https://doi.org/10.1017/S1092852916000262>

Du, K. (2014). *and Statistical*.

Ducottet, C., & Belzung, C. (2004). Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiology and Behavior*, *81*(3), 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.01.013>

Duric, V., Banasr, M., Licznanski, P., Schmidt, H. D., Craig, A., Simen, A. A., ... Duman,

R. S. (2011). *HHS Public Access*. 16(11), 1328–1332.  
<https://doi.org/10.1038/nm.2219.Negative>

Eaton, W. W., Martins, S. S., Nestadt, G., Bienvenu, O. J., Clarke, D., & Alexandre, P. (2008). The burden of mental disorders. *Epidemiologic Reviews*, 30(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1093/epirev/mxn011>

Edmunds, J. W., Mahadevan, L. C., & Clayton, A. L. (2008). Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO Journal*, 27(2), 406–420. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601967>

Effects, P., & Reward, O. N. (1983). *Research Papers*. 9, 129–141.

Enge, S., Fleischhauer, M., Lesch, K. P., Reif, A., & Strobel, A. (2014). Variation in key genes of serotonin and norepinephrine function predicts gamma-band activity during goal-directed attention. *Cerebral Cortex*, 24(5), 1195–1205.  
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhs398>

Estimates, G. H. (n.d.). *Depression and Other Common Mental Disorders Global Health Estimates*.

Eulenburg, V., & Gomeza, J. (2010). Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 103–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.01.003>

Farooq, Z., Banday, S., Pandita, T. K., & Altaf, M. (2016). The many faces of histone H3K79 methylation. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 768, 46–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.005>

Feinstein, D. L., Kalinin, S., & Braun, D. (2016). Causes, consequences, and cures for neuroinflammation mediated via the locus coeruleus: noradrenergic signaling system.

*Journal of Neurochemistry*, 139, 154–178. <https://doi.org/10.1111/jnc.13447>

Felger, J. C. (2019). Role of Inflammation in Depression and Treatment Implications. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 250, 255–286. [https://doi.org/10.1007/164\\_2018\\_166](https://doi.org/10.1007/164_2018_166)

Fenton, E. Y., Fournier, N. M., Lussier, A. L., Romay-Tallon, R., Caruncho, H. J., & Kalynchuk, L. E. (2015). Imipramine protects against the deleterious effects of chronic corticosterone on depression-like behavior, hippocampal reelin expression, and neuronal maturation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 60, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.02.001>

Fiest, K. M., Hitchon, C. A., Bernstein, C. N., Peschken, C. A., Walker, J. R., Graff, L. A., ... Marrie, R. A. (2017). Systematic review and meta-analysis of interventions for depression and anxiety in persons with rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology*, 23(8), 425–434. <https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000000489>

Fiszbein, A., & Kornblihtt, A. R. (2016). Histone methylation, alternative splicing and neuronal differentiation. *Neurogenesis*, 3(1). <https://doi.org/10.1080/23262133.2016.1204844>

Flint, J., & Kendler, K. S. (2014). The Genetics of Major Depression. *Neuron*, 81(3), 484–503. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.027>

Fujimaki, K., Ogihara, T., Morris, D. L., Oda, H., Iida, H., Fujitani, Y., ... Watada, H. (2015). SET7/9 enzyme regulates cytokine-induced expression of inducible nitric-oxide synthase through methylation of Lysine 4 at histone 3 in the islet  $\beta$  cell. *Journal of Biological Chemistry*, 290(27), 16607–16618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661777>

Fuks, F. (2005). DNA methylation and histone modifications: Teaming up to silence

genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 15(5 SPEC. ISS.), 490–495.

<https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.08.002>

Gang, X. W., Yang, Y., Feng, B. Y., & Li, H. (2018). *The behavioral study on the interactive aggravation between pruritus and depression*. (March), 1–9.

<https://doi.org/10.1002/brb3.964>

Gao, Y., & Ge, W. (2018). The histone methyltransferase DOT1L inhibits osteoclastogenesis and protects against osteoporosis article. *Cell Death and Disease*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0040-5>

Garcia-Garcia, A. L., Elizalde, N., Matrov, D., Harro, J., Wojcik, S. M., Venzala, E., ... Tordera, R. M. (2009). Increased Vulnerability to Depressive-Like Behavior of Mice with Decreased Expression of VGLUT1. *Biological Psychiatry*, 66(3), 275–282.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.02.027>

Geue, K., Göbel, P., Leuteritz, K., Nowe, E., Sender, A., Stöbel-Richter, Y., & Friedrich, M. (2019). Anxiety and depression in young adult German cancer patients: Time course and associated factors. *Psycho-Oncology*, 28(10), 2083–2090.

<https://doi.org/10.1002/pon.5197>

Giuseppe, C., Giovanni, D., Msd, M., Ramsay, R. R., Deurwaerdère, P. De, & Giovanni, G. Di. (2016). *Updating neuropathology and neuropharmacology of monoaminergic systems*. 2065–2068. <https://doi.org/10.1111/bph.13508>

Gold, P. W. (2015). The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. *Molecular Psychiatry*, 20(1), 32–47.

<https://doi.org/10.1038/mp.2014.163>

Grayson, D. R., & Guidotti, A. (2013). The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, 38(1),

138–166. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.125>

Green, T., Flash, S., & Reiss, A. L. (2019). Sex differences in psychiatric disorders: what we can learn from sex chromosome aneuploidies. *Neuropsychopharmacology*, *44*(1), 9–21. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0153-2>

Gruden, M. A., Ratmirov, A. M., Storozheva, Z. I., Solovieva, O. A., Sherstnev, V. V., & Sewell, R. D. E. (2018). The Neurogenesis Actuator and NR2B/NMDA Receptor Antagonist Ro25-6981 Consistently Improves Spatial Memory Retraining Via Brain Region-Specific Gene Expression. *Journal of Molecular Neuroscience*, *65*(2), 167–178. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1083-5>

Gruzdev, S. K., Yakovlev, A. A., Druzhkova, T. A., Guekht, A. B., & Gulyaeva, N. V. (2019). The Missing Link: How Exosomes and miRNAs can Help in Bridging Psychiatry and Molecular Biology in the Context of Depression, Bipolar Disorder and Schizophrenia. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *39*(6), 729–750. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00684-6>

Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2007). A Chromatin Landmark and Transcription Initiation at Most Promoters in Human Cells. *Cell*, *130*(1), 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.042>

Guest, P. C. (2019). Preface. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1178*(Mdd), v–vi. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-05542-4>

Guo, J. Y., Huo, H. R., Li, L. F., Guo, S. Y., & Jiang, T. L. (2009). Sini Tang prevents depression-like behavior in rats exposed to chronic unpredictable stress. *American Journal of Chinese Medicine*, *37*(2), 261–272. <https://doi.org/10.1142/S0192415X0900693X>

Haroon, E., Chen, X., Li, Z., Patel, T., Woolwine, B. J., Hu, X. P., ... Miller, A. H. (2018).

Increased inflammation and brain glutamate define a subtype of depression with decreased regional homogeneity, impaired network integrity, and anhedonia. *Translational Psychiatry*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0241-4>

Haroon, E., Raison, C. L., & Miller, A. H. (2012). Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: Translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 137–162. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.205>

Hauer, M. H., & Gasser, S. M. (2017). Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes and Development*, 31(22), 2204–2221. <https://doi.org/10.1101/gad.307702.117>

Heim, C., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H., & Nemeroff, C. B. (2008). The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 693–710. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.03.008>

Herbison, C. E., Allen, K., Robinson, M., Newnham, J., & Pennell, C. (2017). The impact of life stress on adult depression and anxiety is dependent on gender and timing of exposure. *Development and Psychopathology*, 29(4), 1443–1454. <https://doi.org/10.1017/S0954579417000372>

Hercher, C., Canetti, L., Turecki, G., & Mechawar, N. (2010). Anterior cingulate pyramidal neurons display altered dendritic branching in depressed suicides. *Journal of Psychiatric Research*, 44(5), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.08.011>

Hill, M. N., Helleman, K. G. C., Verma, P., Gorzalka, B. B., & Weinberg, J. (2012). Neurobiology of chronic mild stress: Parallels to major depression. *Neuroscience and*

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.001>

Hinson, S. R., Roemer, S. F., Lucchinetti, C. F., Fryer, J. P., Kryzer, T. J., Chamberlain, J. L., ... Lennon, V. A. (2008). Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-Regulating EAAT2. *Journal of Experimental Medicine*, 205(11), 2473–2481. <https://doi.org/10.1084/jem.20081241>

Holsboer, F. (2013). The Corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Depression: The Science of Mental Health*, 6(00), 219–244.

Horta, R. N., Kahl, V. F. S., Sarmiento, M. D. S., Nunes, M. F. S., Porto, C. R. M., Andrade, V. M. De, ... Silva, J. Da. (2016). Protective effects of acerola juice on genotoxicity induced by iron in vivo. *Genetics and Molecular Biology*, 39(1), 122–128. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0157>

Howren, M. B., Lamkin, D. M., & Suls, J. (2009). Associations of depression with c-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, 71(2), 171–186. <https://doi.org/10.1097/PSY.0b013e3181907c1b>

Hu, T. M., Chen, S. J., Hsu, S. H., & Cheng, M. C. (2019). Functional analyses and effect of DNA methylation on the EGR1 gene in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 275(March), 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.03.044>

Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(4), e324-22. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>

Iob, E., Kirschbaum, C., & Steptoe, A. (2018). Positive and negative social support and HPA-axis hyperactivity: Evidence from glucocorticoids in human hair. *Psychoneuroendocrinology*, 96(April), 100–108.

<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.06.008>

lob, E., Kirschbaum, C., & Steptoe, A. (2019). Persistent depressive symptoms, HPA-axis hyperactivity, and inflammation: the role of cognitive-affective and somatic symptoms. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0501-6>

Jackson, S. E., Kirschbaum, C., & Steptoe, A. (2017). Hair cortisol and adiposity in a population-based sample of 2,527 men and women aged 54 to 87 years. *Obesity*, *25*(3), 539–544. <https://doi.org/10.1002/oby.21733>

Jang, H. M., Lee, K. E., & Kim, D. H. (2019). The preventive and curative effects of lactobacillus reuteri NK33 and bifidobacterium adolescentis NK98 on immobilization stress-induced anxiety/depression and colitis in mice. *Nutrients*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/nu11040819>

Jiang, Y., Loh, Y. H. E., Rajarajan, P., Hirayama, T., Liao, W., Kassim, B. S., ... Akbarian, S. (2017). The methyltransferase SETDB1 regulates a large neuron-specific topological chromatin domain. *Nature Genetics*, *49*(8), 1239–1250. <https://doi.org/10.1038/ng.3906>

Jmjd, C. C. B. P., Dotti, C. G., Martin, M. G., Palomer, E., Carretero, J., & Benvegnu, S. (2016). *Neuronal activity controls Bdnf expression via activation in mature neurons*. <https://doi.org/10.1038/ncomms11081>

John R.Giudicessi, BA.Michael J.Ackerman., 2013. (2008). 基因的改变NIH Public Access. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Jorgensen, A., Breitenstein, K., Kalliokoski, O., Weimann, A., Poulsen, H. E., Jorgensen, M. B., & Wörtwein, G. (2019). *Markers of HPA-axis activity and nucleic acid damage from oxidation after electroconvulsive stimulations in rats Correspondence :*

Anders Jorgensen , M . D . , Ph . D , Psychiatric Centre Copenhagen ( Rigshospitalet )  
Edel Sauntes Allé 10 , DK-2100 Copenhag. 1–29.

Jürgen, H., Borwin, M., Hans, B., Volz, P., Barnikol, U. B., Seifritz, E., ... Kasper, S.  
(2016). The relevance of ' mixed anxiety and depression ' as a diagnostic category in  
clinical practice. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1007/s00406-016-0684-7>

Karyotaki, E., Smit, Y., Holdt Henningsen, K., Huibers, M. J. H., Robays, J., De Beurs,  
D., & Cuijpers, P. (2016). Combining pharmacotherapy and psychotherapy or  
monotherapy for major depression? A meta-analysis on the long-term effects. *Journal  
of Affective Disorders*, 194, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.01.036>

Katz, R. J., & Baldrighi, G. (1982). A further parametric study of imipramine in an animal  
model of depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 16(6), 969–972.  
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(82\)90054-5](https://doi.org/10.1016/0091-3057(82)90054-5)

Katz, R. J., & Hersh, S. (1981). Amitriptyline and scopolamine in an animal model of  
depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 5(2), 265–271.  
[https://doi.org/10.1016/0149-7634\(81\)90008-7](https://doi.org/10.1016/0149-7634(81)90008-7)

Katz, R. J., Roth, K. A., & Carroll, B. J. (1981). Acute and chronic stress effects on  
open field activity in the rat: Implications for a model of depression. *Neuroscience and  
Biobehavioral Reviews*, 5(2), 247–251. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(81\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0149-7634(81)90005-1)

Katz, R. J., Roth, K. A., & Schmaltz, K. (1981). Amphetamine and tranlycypromine in  
an animal model of depression: Pharmacological specificity of the reversal effect.  
*Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 5(2), 259–264.  
[https://doi.org/10.1016/0149-7634\(81\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0149-7634(81)90007-5)

Kaufman, J., Plotsky, P. M., Nemeroff, C. B., & Charney, D. S. (2000). Effects of early adverse experiences on brain structure and function: Clinical implications. *Biological Psychiatry*, 48(8), 778–790. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00998-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00998-7)

Kawada, T. (2014). Depressive symptoms and HbA1c in patients with Type 1 and Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 31(6), 759–760. <https://doi.org/10.1111/dme.12419>

Kessler, R. C. (2003). *Epidemiology of women and depression*. 74, 5–13.

Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Swartz, M., Blazer, D. G., & Nelson, C. B. (1993). Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *Journal of Affective Disorders*, 29(2–3), 85–96. [https://doi.org/10.1016/0165-0327\(93\)90026-G](https://doi.org/10.1016/0165-0327(93)90026-G)

Kevin Range, and D. M. Y. A. M. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Khundakar, A. A., Morris, C. M., Oakley, A. E., & Thomas, A. J. (2011). Psychiatry Research: Neuroimaging Cellular pathology within the anterior cingulate cortex of patients with late-life depression: A morphometric study. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 194(2), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.pscychresns.2011.04.008>

Kim, J. H., Lee, J. H., Lee, I. S., Lee, S. B., & Cho, K. S. (2017). Histone lysine methylation and neurodevelopmental disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms18071404>

Kim, W., Choi, M., & Kim, J. (2014). *The histone methyltransferase Dot1 / DOT1L as a critical regulator of the cell cycle*. 13(5), 726–738.

Kirkpatrick, J. E., Kirkwood, K. L., Woster, P. M., Kirkpatrick, J. E., Kirkwood, K. L., & Inhibition, P. M. W. (2018). Ac ce pt us cr t. *Epigenetics*, 0(0), 1.

<https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1481703>

Kong, H., Zeng, X., Fan, Y., Yuan, S., Ge, S., Xie, W., ... Hu, G. (2014). *Aquaporin-4 Knockout Exacerbates Corticosterone-Induced Depression by Inhibiting Astrocyte Function and Hippocampal Neurogenesis*. 20, 391–402.

<https://doi.org/10.1111/cns.12222>

Kouzarides, T. (2007). *Review Chromatin Modifications and Their Function*. 693–705.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

Krogh, J., Mors, O., & Benros, M. E. (2016). *Inflammation in Depression and the Potential for Anti-Inflammatory Treatment*. 732–742.

<https://doi.org/10.2174/1570159X14666151208113>

Krystal, J. H., & State, M. W. (2014). *Review Psychiatric Disorders : Diagnosis to Therapy*. *Cell*, 157(1), 201–214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.042>

Kurita, M., Moreno, J. L., Holloway, T., Kozlenkov, A., Mocci, G., García-bea, A., ... Neurology, J. G. M. (2013). *Repressive Epigenetic Changes at the mGlu2 Promoter in Frontal Cortex of 5-HT 2A Knockout Mice*. (June), 1166–1175.

Kurlansik, S. L., Maffei, M. S., Family, V., & Residency, M. (2016). *Somatic Symptom Disorder*.

Lapmanee, S., Charoenphandhu, J., & Teerapornpuntakit, J. (2017). *exercise effectively prevent anxiety- and depression-like behaviors and memory impairment in restraint stressed rats*. 1–23.

Lazaroni, T. L. N., Cláudia, A., Raslan, S., Fontes, W. R. P., Oliveira, M. L. De, Bader, M., ... Pereira, G. S. (2012). *Neurobiology of Learning and Memory Angiotensin- ( 1 – 7 )/ Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory*.

*Neurobiology of Learning and Memory*, 97(1), 113–123.

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.10.003>

Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., ... Young, R. A. (2006). *Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells*. 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.043>

Leeuwen, F. Van, Gafken, P. R., & Gottschling, D. E. (2002). *Dot1p Modulates Silencing in Yeast by Methylation of the Nucleosome Core*. 109, 745–756.

Leonard, B. E. (2010). *system*. 6(3), 205–212.

<https://doi.org/10.2174/157339510791823835>.The

Leonard, B. E. (2017). *Inflammation and depression : a causal or coincidental link to the pathophysiology ?* 1–16. <https://doi.org/10.1017/neu.2016.69>

Levey, D. F., Polimanti, R., Cheng, Z., Zhou, H., Nuñez, Y. Z., Jain, S., ... Stein, M. B. (2019). Genetic associations with suicide attempt severity and genetic overlap with major depression. *Translational Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0340-2>

Li, G. (2013). *Decoding the Histone Code : Role of H3K36me3 in Mismatch Repair and Implications for Cancer Susceptibility and Therapy* *Decoding the Histone Code : Role of H3K36me3 in Mismatch Repair and Implications for Cancer Susceptibility and*. 6379–6383. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1870>

Li, J., Yang, R., Xia, K., Wang, T., Nie, B., Gao, K., ... Wang, W. (2018). *Effects of stress on behavior and resting- state fMRI in rats and evaluation of Telmisartan therapy in a stress-induced depression model*. 1–13.

Li, K., Shen, S., Li, Y. J. X., & Wang, L. Z. X. (2018). Melatonin Augments the Effects

of Fluoxetine on Depression-Like Behavior and Hippocampal BDNF – TrkB Signaling. *Neuroscience Bulletin*, 34(2), 303–311. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0189-z>

Li, S., Zong, L., Hou, Y., Zhang, W., Zhou, L., Yang, Q., & Wang, L. (2019). *Altered DNA methylation of the Alu Y subfamily in schizophrenia and bipolar disorder*. 11, 581–586.

Lima-ojeda, J. M., Rupprecht, R., Baghai, T. C., Rupprecht, R., Baghai, T. C., Lima-ojeda, J. M., ... Baghai, T. C. (2018). Neurobiology of depression: A neurodevelopmental approach. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 19(5), 349–359. <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1289240>

Lin, E., & Tsai, S. (2019). *Epigenetics and Depression : An Update*. 654–661.

Lin, W. (2018). *Blocking p38 Signaling Reduces the Activation of Pro-inflammatory Cytokines and the Phosphorylation of p38 in the Habenula and Reverses Depressive-Like Behaviors Induced by Neuroinflammation*. 9(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00511>

Lister, R., Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., ... He, C. (2014). *Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development*. (2013). <https://doi.org/10.1126/science.1237905>

Liu, D., Qiu, H., Fei, H., Hu, X., Xia, H., Wang, L., ... Zhou, Q. (2014). *Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1177/1535370213513987>

Liu, Q., Li, B., Zhu, H., & Wang, Y. (2009). Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. *European Neuropsychopharmacology*, 19(11), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.06.010>

Liu, W., Xue, X., Xia, J., Liu, J., & Qi, Z. (2017). Swimming exercise reverses CUMS-induced changes in depression-like behaviors and hippocampal plasticity-related proteins. *Journal of Affective Disorders*, 227(September), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.10.019>

Liu, Yang, Ho, R. C., & Mak, A. (2012). Interleukin ( IL ) -6 , tumour necrosis factor alpha ( TNF-  $\alpha$  ) and soluble interleukin-2 receptors ( sIL-2R ) are elevated in patients with major depressive disorder : A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Affective Disorders*, 139(3), 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.08.003>

Liu, Yi-yun, Zhou, X., Yang, L., & Wang, H. (2017). *Social defeat stress causes depression-like behavior with metabolite changes in the prefrontal cortex of rats.* 1–16.

Liu, Yi, Zhao, J., Fan, X., & Guo, W. (2019). *Dysfunction in Serotonergic and Noradrenergic Systems and Somatic Symptoms in Psychiatric Disorders.* 10(May), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00286>

Liu, Yongqing, Li, M., Fan, M., Song, Y., Yu, H., Zhi, X., & Xiao, K. (2019). Archival Report Chromodomain Y-like Protein – Mediated Histone Crotonylation Regulates Stress-Induced Depressive Behaviors. *Biological Psychiatry*, (11), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.11.025>

Lockwood, L. E., Su, S., & Youssef, N. A. (2015). The role of epigenetics in depression and suicide : A platform for gene – environment interactions. *Psychiatry Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.05.071>

Loftis, J. M., Huckans, M., & Morasco, B. J. (2010). Neurobiology of Disease Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression : Current theories and novel treatment strategies. *Neurobiology of Disease*, 37(3), 519–533. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.015>

Lopizzo, N., Zonca, V., Cattane, N., Pariante, C. M., & Cattaneo, A. (2019). miRNAs in depression vulnerability and resilience: novel targets for preventive strategies. *Journal of Neural Transmission*, 126(9), 1241–1258. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02048-2>

Lysine, H., & Family, K. D. M. (2016). *Accepted Article Preview : Published ahead of advance online publication*. (October), 1–30. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.231>

Machado-Vieira, R., Salvadore, G., Luckenbaugh, D. A., Manji, H. K., & Zarate, C. A. (2008). Rapid onset of antidepressant action: A new paradigm in the research and treatment of major depressive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 69(6), 946–958. <https://doi.org/10.4088/JCP.v69n0610>

Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., & Gris, D. (2019). *Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release*. 1–27. <https://doi.org/10.3390/cells8020184>

Manuscript, A. (2009). *Nihms78110.Pdf*. 64(10), 863–870. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.008>. Glial

Manuscript, A. (2010). *NIH Public Access*. 62(6), 617–627. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.617>. Prevalence

Manuscript, A. (2011). *Protein in the Prefrontal Cortex in Major Depression*. 29(11), 2088–2096. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300525>. Age-Dependent

Martin, C., Zhang, Y., Medical, H. H., Hill, C., & Carolina, N. (2005). *THE DIVERSE FUNCTIONS OF HISTONE LYSINE METHYLATION*. 6(November), 838–849. <https://doi.org/10.1038/nrm1761>

Matosin, N., Halldorsdottir, T., & Binder, E. B. (2018). Understanding the Molecular

Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The FKBP5 Model. *Biological Psychiatry*, 83(10), 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.01.021>

Mccarthy, M. J., Barrett, T. B., Nissen, S., Kelsoe, J. R., & Turner, E. E. (2010). Allele specific analysis of the ADRBK2 gene in lymphoblastoid cells from bipolar disorder patients. *Journal of Psychiatric Research*, 44(4), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.08.010>

Mcewen, B. S. (2010). *Stress , sex , and neural adaptation to a changing environment : mechanisms of neuronal remodeling*. 1204, 38–60. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05568.x>

Mcnally, B. L., & Bhagwagar, Z. (2010). *and Glia in Depression : A Literature Review*. 501–510.

Mellios, N., Feldman, D. A., Sheridan, S. D., Ip, J. P. K., Kwok, S., Amoah, S. K., ... Sur, M. (2017). *MeCP2-regulated miRNAs control early human neurogenesis through differential effects on ERK and AKT signaling*. (July 2016), 1–15. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.86>

Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M. O., & Anisman, H. (2004). *Dysregulation in the Suicide Brain : mRNA Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors and GABA A Receptor Subunits in Frontal Cortical Brain Region*. 24(6), 1478–1485. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4734-03.2004>

Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P. J., Brown, D. T., & Misteli, T. (2012). Erratum Hyperdynamic Plasticity of Chromatin Proteins in Pluripotent Embryonic Stem Cells. *Developmental Cell*, 22(1), 233–234. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.005>

Mico, J. A. (2019). *Monoaminergic system and depression*. 107–113.

Moraes, M. T., Galv, M. C., Cabral, D., Coelho, C. P., Queiroz-hazarbassanov, N., Martins, M. F. M., ... Kirsten, T. B. (2017). *Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior Induced by Lipopolysaccharide in Rats via Neuroinflammatory Pathway*. 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169446>

Moussavi, S., Chatterji, S., Verdes, E., Tandon, A., Patel, V., & Ustun, B. (n.d.). *Depression , chronic diseases , and decrements in health* : 29–32.

Nagy, C., Torres-Platas, S. G., Mechawar, N., & Turecki, G. (2017). Repression of astrocytic connexins in cortical and subcortical brain regions and prefrontal enrichment of H3K9me3 in depression and suicide. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 20(1), 50–57. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw071>

Nakajima, K., Ito, Y., Kikuchi, S., Okano, H., Takashima, K., Woo, G. H., ... Shibutani, M. (2020). Developmental exposure to diacetoxyscirpenol reversibly disrupts hippocampal neurogenesis by inducing oxidative cellular injury and suppressed differentiation of granule cell lineages in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 136(November 2019), 111046. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111046>

Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., & Grewal, S. I. S. (2001). *Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly*. 292(April), 110–113.

Nasca, C., Bigio, B., Zelli, D., de Angelis, P., Lau, T., Okamoto, M., ... McEwen, B. S. (2017). Role of the Astroglial Glutamate Exchanger xCT in Ventral Hippocampus in Resilience to Stress. *Neuron*, 96(2), 402-413.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.020>

Nasca, C., Bigio, B., Zelli, D., Nicoletti, F., Mcewen, B. S., & Science, T. (2015). *HHS*

*Public Access*. 20(6), 755–763. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.96>.Mind

Navrady, L. B., Adams, M. J., Chan, S. W. Y., Depressive, M., Working, D., Consortium, G., & Ritchie, S. J. (2017). *Genetic risk of major depressive disorder : the moderating and mediating effects of neuroticism and psychological resilience on clinical and self-reported depression*.

Palmfeldt, J., Henningsen, K., Aistrup, S., Müller, H. K., & Wiborg, O. (2016). Molecular and Cellular Neuroscience Protein biomarkers of susceptibility and resilience to stress in a rat model of depression. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 74, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.04.001>

Pan, Y., Wang, F., Qiang, L., Zhang, D., & Kong, L. (2010). *Icariin attenuates chronic mild stress-induced dysregulation of the LHPA stress circuit in rats*. 272–283. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.06.020>

Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing : from synapse to behavior. *Trends in Neurosciences*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>

Pappa, S., Padilla, N., Iacobucci, S., Vicioso, M., Álvarez, E., Campa, D., & Navarro, C. (2019). *PHF2 histone demethylase prevents DNA damage and genome instability by controlling cell cycle progression of neural progenitors*. 116(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1903188116>

Pasco, J. A., Nicholson, G. C., Williams, L. J., Jacka, F. N., Henry, M. J., Kotowicz, M. A., ... Berk, M. (2010). *Association of high-sensitivity C-reactive protein with de novo major depression*. 372–377. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.109.076430>

Pathak, S. S., Maitra, S., Chakravarty, S., & Kumar, A. (2016). *Histone Lysine Demethylases of JMJD2 or KDM4 Family are Important Epigenetic Regulators in*

*Reward Circuitry in the Etiopathology of Depression.* 42(4), 854–863.

<https://doi.org/10.1038/npp.2016.231>

Pe, C. J., Bagot, R. C., Labont, B., & Nestler, E. J. (2014). NU SC. *Journal of Molecular Biology.* <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.016>

Peña, C. J., & Nestler, E. J. (2018). *Progress in Epigenetics of Depression.* 157, 41–66. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.12.011>

Popoli, M., Yan, Z., Mcewen, B. S., & Sanacora, G. (2011). *The stressed synapse : the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission.* 13(November). <https://doi.org/10.1038/nrn3138>

Portela, A., & Esteller, M. (2010). review Epigenetic modifications and human disease. *Nature Publishing Group*, 28(10), 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>

*PS194 Discovery of serum protein biomarkers in drug-free PS193 MicroRNAs as biomarkers for treatment-resistant PS195 Reduced cerebrospinal fluid ethanolamine concen-. (n.d.). (Mdd), 900.*

Qiao, M., Jiang, Q., Liu, Y., Hu, X., & Wang, L. (2019). *Antidepressant mechanisms of venlafaxine involving increasing histone acetylation and modulating tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase expression in hippocampus of depressive rats.* 255–261. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001191> *raadsheer 1994.pdf.* (n.d.).

Rao, R. C., & Dou, Y. (2015). Hijacked in cancer: the KMT2 ( MLL ) family of methyltransferases. *Nature Publishing Group*, 15(6), 334–346. <https://doi.org/10.1038/nrc3929>

Raudensky, J., & Yamamoto, B. K. (2007). *Effects of chronic unpredictable stress and*

*methamphetamine on hippocampal glutamate function.* 5, 3–9.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.002>

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., ... Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), 593–599. <https://doi.org/10.1038/35020506>

Reinhart, L., Knight, W., Roberts, L., & Mendes, C. (2012). HHS Public Access Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2163–2196. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2).Years

Réus, G. Z., Carlessi, A. S., Silva, R. H., & Ceretta, L. B. (2019). *Review Article Relationship of Oxidative Stress as a Link between Diabetes Mellitus and Major Depressive Disorder.* 2019(Mdd). <https://doi.org/10.1155/2019/8637970>

Réus, G. Z., Moura, A. B. De, Silva, R. H., Resende, W. R., & Quevedo, J. (2018). *Resilience Dysregulation in Major Depressive Disorder: Focus on Glutamatergic Imbalance and Microglial Activation.* 297–307. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170630164715>

Robins, E. (1977). *Diagnostic Criteria.*

Robins, E. L. I. (n.d.). *Eli robins.*

Rodrigues, R., & Petersen, R. B. (2014). *Parallels Between Major Depressive Disorder and Alzheimer ' s Disease: Role of Oxidative Stress and Genetic Vulnerability.* <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0074-5>

Rodriguez-zas, A. S. L., Wu, C., Bruce, R., Connor, J. C. O., Nixon, S. E., Garcia, R., ... Kelley, K. W. (2018). Disruption of microglia histone acetylation and protein pathways in mice exhibiting inflammation-associated depression-like symptoms.

*Psychoneuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.06.024>

Rose, C. R., Ziemens, D., Untiet, V., & Fahlke, C. (2016). Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.013>

Rose, N. (2013). *The Human Sciences in a Biological Age*. <https://doi.org/10.1177/0263276412456569>

Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). *On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory*. 36–46. <https://doi.org/10.1101/lm.422607.2005>

Rounds, G. (2002). Gold, P.W. Chrousos, G.P. *Molecular Psychiatry*, 7, 254–275. <https://doi.org/10.1038/sj/mp/4001032>

Ruderfer, D. M., Ripke, S., Mcquillin, A., Boocock, J., Stahl, E. A., Pavlides, J. M. W., ... Nisenbaum, L. (2019). *HHS Public Access*. 173(7), 1705–1715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.046>.Corresponding

Sadakierska-chudy, A., & Jastrz, J. (2017). *Cocaine Administration and Its Withdrawal Enhance the Expression of Genes Encoding Histone-Modifying Enzymes and Histone Acetylation in the Rat Prefrontal Cortex*. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9728-7>

Sciences, M. L. (2009). *Review Dynamic protein methylation in chromatin biology*. 66, 407–422. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8303-z>

Senapati, P., Kato, H., Lee, M., Leung, A., Thai, C., Sanchez, A., ... Schones, D. E. (2019). Hyperinsulinemia promotes aberrant histone acetylation in triple - negative breast cancer. *Epigenetics & Chromatin*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13072-019->

0290-9

Shilatifard, A. (2006). *Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression*. 243–272. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422>

Shirayama, Y., Takahashi, M., Osone, F., Hara, A., & Okubo, T. (2016). Author 's Accepted Manuscript. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2016.11.006>

Shukla, V., Koshy, V., Prasada, S., Mallya, S., Chakrabarty, S., Jayaram, P., ... Banerjee, S. (2019). Gynecologic Oncology Enumeration of deregulated miRNAs in liquid and tissue biopsies of cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, *155*(1), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.08.012>

Si, Y., & Song, Z. (2018). *microRNA and mRNA profiles in nucleus accumbens underlying depression versus resilience in response to chronic stress*. (March), 1–17. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32651>

Sinha, K. M., Yasuda, H., Coombes, M. M., Dent, S. Y. R., & Crombrughe, B. De. (2009). Regulation of the osteoblast-specific transcription factor Osterix by NO66 , a Jumonji family histone demethylase. *The EMBO Journal*, *29*(1), 68–79. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.332>

Smoller, J. W., Kendler, K., Craddock, N., Lee, P. H., Neale, B. M., Nurnberger, J. N., ... O'Donovan, M. (2013). Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: A genome-wide analysis. *The Lancet*, *381*(9875), 1371–1379. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62129-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62129-1)

Sofroniew, M. V. (2009). *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. (September). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>

Son, H., Yang, J. H., Kim, H. J., & Lee, D. K. (2019). *A Chronic Immobilization Stress Protocol for Inducing Depression-Like Behavior in Mice*. (May), 1–7.  
<https://doi.org/10.3791/59546>

Southwick, S. M., & Charney, D. S. (2005). *THE PSYCHOBIOLOGY OF DEPRESSION AND RESILIENCE TO STRESS: Implications for CONTENTS*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.1.102803.143948>

Souza, D. G., Almeida, R. F., Souza, D. O., & Zimmer, E. R. (2019). The astrocyte biochemistry. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, (March), 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.04.002>

Souza, T. G. De, Rosa, T., Matos, D., Tuon, T., Garbossa, L., Strassi, A. P., ... Petronilho, F. (2017). Acute treatment with ketamine and chronic treatment with minocycline exert antidepressant-like effects and antioxidant properties in rats subjected different stressful events. *Brain Research Bulletin*.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.12.005>

Strohman, C. (2014). *GENETIC DETERMINISM AS A FAILING PARADIGM IN BIOLOGY AND MEDICINE: IMPLICATIONS FOR HEALTH AND WELLNESS* Author (s): Richard C . Strohman Source : *Journal of Social Work Education* , Vol . 39 , No . 2 ( SPRING / SUMMER 2003 ), pp . 169-191 Published by : 39(2), 169–191.

Sun, H., Kennedy, P. J., & Nestler, E. J. (2012). *Epigenetics of the Depressed Brain: Role of Histone Acetylation and Methylation*. 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/npp.2012.73>

Sun, X., Song, Z., Si, Y., & Wang, J. (2018). *PT US. Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.05.023>

Szewczyk, B., Poleszak, E., Sowa-kuæama, M., Siwek, M., Dudek, D., Ryszewska-pokraœniewicz, B., ... Nowak, G. (2008). *Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action*. 588–599.

Tafet, G. E., Ph, D., Nemeroff, C. B., & Ph, D. (2016). *The Links Between Stress and Depression : Psychoneuroendocrinological , Genetic , and Environmental Interactions*. 77–88. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.15030053>

Tavakolizadeh, J., Roshanaei, K., Salmaninejad, A., Yari, R., Sadri, J., Sarkarizi, H. K., ... Branch, T. (2017). *MicroRNAs and Exosomes in Depression: Potential Diagnostic Biomarkers †*. (November). <https://doi.org/10.1002/jcb.26599>

Thorlin, T., Roginski, R. S., Choudhury, K., Nilsson, M., Hansson, E., & Y, P. S. E. (1998). *Regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 by glutamate and N -opioid receptor stimulation*. 425, 453–459.

Titus, S. E., Abelaira, H. M., Sharon, M., & Tuon, T. (2016). Neurochemical correlation between major depressive disorder and neurodegenerative diseases. *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.06.027>

Veœeœa, J., Bártová, E., Krejčí, J., Legartová, S., Kuœerová, J. R.-, Tibor, Š., ... Micale, V. (2017). *HDAC1 and HDAC3 underlie dynamic H3K9 acetylation during embryonic neurogenesis and in schizophrenia-like animals † Although histone acetylation is one of the most widely studied epigenetic modifications , there*. (September 2016), 1–42. <https://doi.org/10.1002/jcp.25914>

Vythilingam, M., Heim, C., Ph, D., Newport, J., Miller, A. H., Anderson, E., ... Ph, D. (2011). *NIH Public Access*. 159(12), 2072–2080.

Wang, H., Huang, F., Hu, Z., & Zhang, W. (2017). Early-Life Social Isolation-Induced Depressive-Like Behavior in Rats Results in Microglial Activation and Neuronal

Histone Methylation that Are Mitigated by Minocycline. *Neurotoxicity Research*.

<https://doi.org/10.1007/s12640-016-9696-3>

Wang, M., Wei, J., Yang, X., Ni, P., Wang, Y., Zhao, L., ... Li, T. (2019). *The level of IL-6 was associated with sleep disturbances in patients with major depressive disorder.*

Wang, X., Gao, W., Ma, X., Wang, X., Song, C., Huang, X., & Liu, H. (2014). *essential to meiosis progression in mouse oocytes.* 35(6), 523–530.

Wang, Y., Wang, J., Guo, T., Peng, Y., Wang, K., Bai, K., & Huang, Y. (n.d.). *Screening of schizophrenia associated miRNAs and the regulation of miR-320a-3p on integrin b 1.*

Wei, J., Antony, J., Meng, F., Maclean, P., Rhind, R., Laible, G., & Oback, B. (2017). *KDM4B-mediated reduction of H3K9me3 and H3K36me3 levels improves somatic cell reprogramming into pluripotency.* (July 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06569-2>

Whiteford, H. A., Degenhardt, L., Rehm, J., Baxter, A. J., Ferrari, A. J., Erskine, H. E., ... Vos, T. (2013). Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 6736(13), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61611-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61611-6)

Whitton, A. E., Treadway, M. T., & Pizzagalli, D. A. (2015). *Reward processing dysfunction in major depression , bipolar disorder and schizophrenia.* 7–12. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000122>

Willner, P. (1997). *Validity , reliability and utility of the chronic mild stress model of depression : a 10-year review and evaluation.* 319–329.

Willner, Paul. (2005). *Chronic Mild Stress ( CMS ) Revisited: Consistency and*

*Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS.* 90–110.

<https://doi.org/10.1159/000087097>

Wium-andersen, M. K., & Ø, D. D. (2013). *Elevated C-Reactive Protein Levels, Psychological Distress, and Depression in 73 131 Individuals.*

<https://doi.org/10.1001/2013.jamapsychiatry.102>

Woalder. (2017). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Wong, M., & Licinio, J. (2001). *RESEARCH AND TREATMENT APPROACHES TO DEPRESSION.* 2(May).

Wood, S. K., Walker, H. E., Valentino, R. J., & Bhatnagar, S. (2015). *Individual Differences in Reactivity to Social Stress Predict Susceptibility and Resilience to a Depressive Phenotype: Role of Corticotropin-Releasing Factor.* 151(April 2010), 1795–1805. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1026>

Xavier, S. (2014). *The meaning of psychotropic drug use for individuals with mental disorders in outpatient monitoring.* 18(2), 323–329. <https://doi.org/10.5935/1414-8145.20140047>

Xiang, D., Xiao, J., Fu, L., Yao, L., Wan, Q., Xiao, L., & Zhu, F. (2019). DNA methylation of the *Tacr2* gene in a CUMS model of depression. *Behavioural Brain Research*, 365(October 2018), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.059>

Yang, L., Zhao, Y., Wang, Y., Liu, L., & Zhang, X. (2015). *The Effects of Psychological Stress on Depression.* 494–504.

Yankelevitch-yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). *The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior.* (March), 1–7.

<https://doi.org/10.3791/52587>

Yeoh, S. W. (2018). Depression , fatigue and neurocognitive deficits in chronic hepatitis C. *Hepatology International*, 5. <https://doi.org/10.1007/s12072-018-9879-5>

Yildiz-yesiloglu, A., & Pauler, D. (2006). *Review of 1 H magnetic resonance spectroscopy findings in major depressive disorder : A meta-analysis*. 147, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2005.12.004>

Yin, L., Xu, X., Chen, G., Mehta, N. D., Haroon, E., Miller, A. H., ... Felger, J. C. (2019). *Brain , Behavior , and Immunity In fl ammation and decreased functional connectivity in a widely-distributed network in depression : Centralized e ffects in the ventral medial prefrontal cortex*. 80(May), 657–666. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.05.011>

Zacharko, R. M., Bowers, W. J., Anisman, H., & Neuro-psychopharmacol, P. (1984). *RESPONDING FOR BRAIN STIMULATION : DESMETHYLIMIPRAMINE STRESS AND*. 601–606.

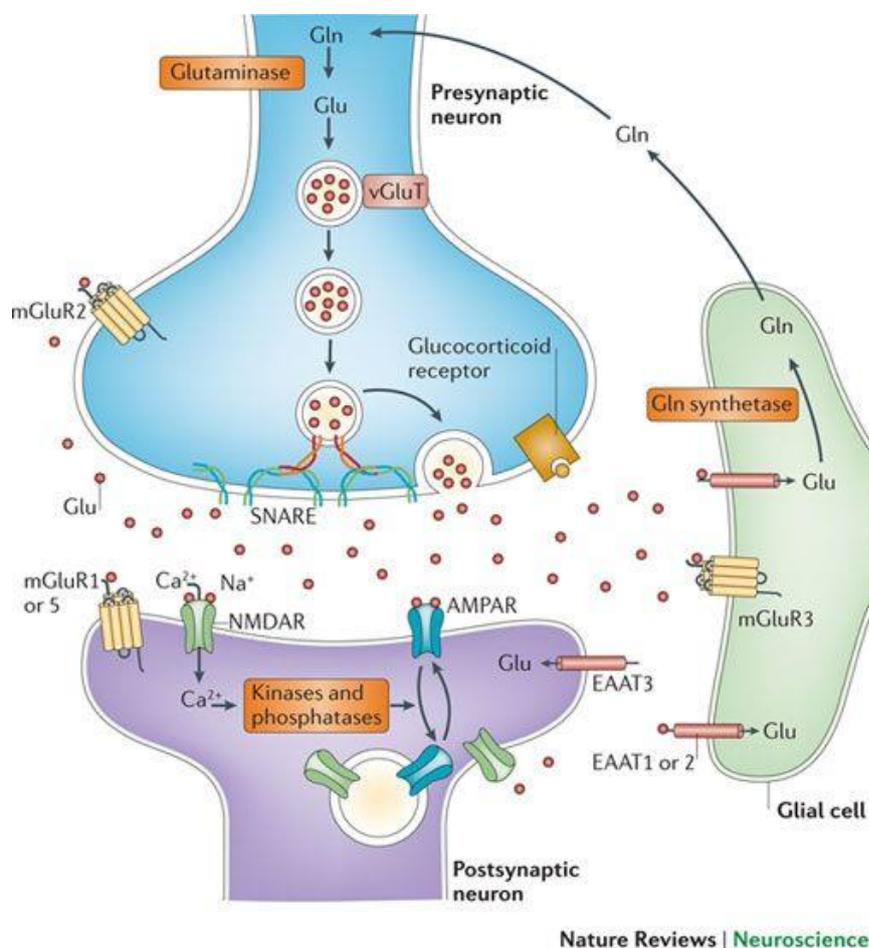
Zhao, F., Chen, Y., Zeng, L., Li, R., Zeng, R., Wen, L., ... Zhang, C. (2010). Role of triptolide in cell proliferation , cell cycle arrest , apoptosis and histone methylation in multiple myeloma U266 cells. *European Journal of Pharmacology*, 646(1–3), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.05.034>

Zhou, D., Chen, Z., Wang, H., & Wang, C. (2016). *cAMP / PKA / CREB / GLT1 signaling involved in the antidepressant-like effects of phosphodiesterase 4D inhibitor ( GEBR-7b ) in rats*. 219–227.

Zhu, C., Blakely, R. D., & Hewlett, W. A. (2006). *The Proinflammatory Cytokines Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha Activate Serotonin Transporters*. 2121–2131. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301029>.

Zielinska, A., Davies, O. T., Meldrum, R. A., & Hodges, N. J. (2011). *Direct Visualization of Repair of Oxidative Damage by OGG1 in the Nuclei of Live Cells*. 25(1), 1–7.

## 8. Lista de figuras



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1: O glutamato é sintetizado a partir da glicose (não mostrada) e GLN fornecida pelas células da glia. No neurônio, o glutamato é transportado em vesículas sinápticas (vGluTs) e as proteínas SNARE medeiam a interação e fusão de vesículas com o membrana pré-sináptica. Após a liberação no espaço extracelular, o glutamato se liga a receptores ionotrópicos como o N -metil-D aspartato receptor (NMDARs) e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico receptor do ácido (AMPARs) e receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1 a mGluR8) na membrana de neurônios pós-sinápticos e células da glia. Após a ligação, haverá a despolarização da membrana, ativação cascatas intracelulares de mensageiros, modulação da síntese proteica e expressão gênica. O glutamato é eliminado da sinapse através dos EAATs presentes nas células gliais. Dentro da célula glial, o glutamato é convertido em GLN que é transportada para os neurônios (Popoli et al., 2011).

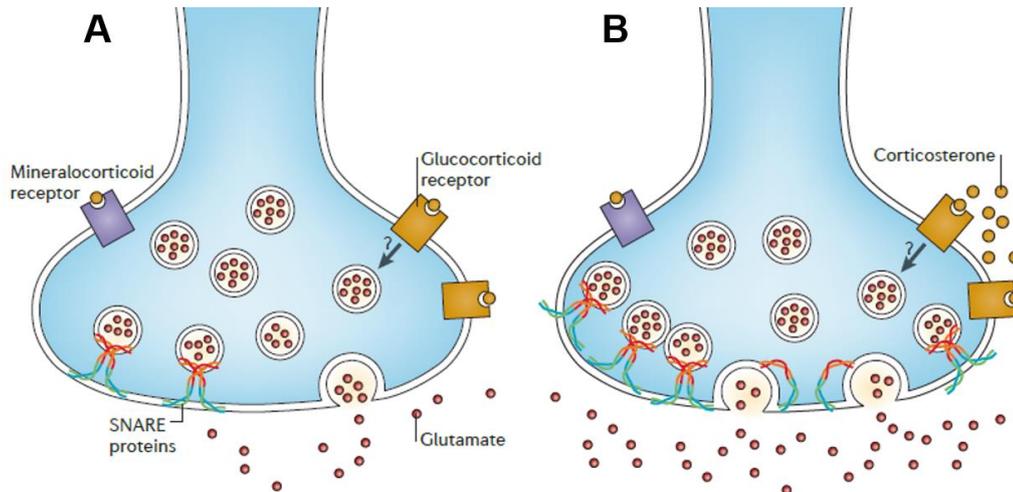


Figura 2: (A) Representa o neurônio em estado de homeostase, possuindo glutamato armazenado em vesículas no neurônio pré-sináptico e um nível basal no espaço extracelular. (B) O estresse ativa a liberação de glutamato de forma exarcebada, causada pela despolarização. A resposta ao estresse envolve um rápido aumento dos níveis circulantes de corticosterona, que se liga a receptores de glicocorticóides localizados na membrana do neurônio pré-sináptico. Isso induz um rápido aumento da liberação de glutamato mediado pelo receptor glicocorticóide e complexos proteicos SNARE (Popoli et al., 2011).

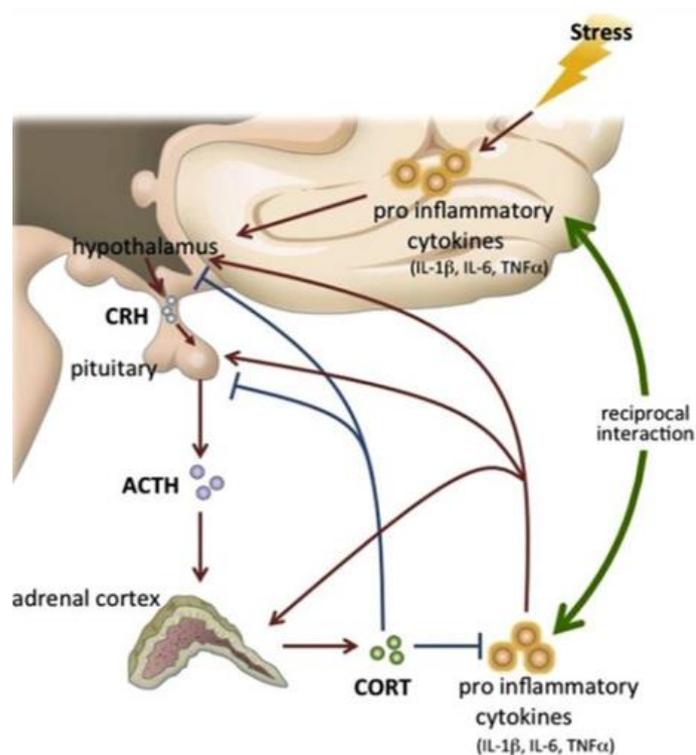


Figura 3: O estresse induz respostas pró-inflamatórias que ativam o eixo HPA. O hormônio liberador de CRF estimula a hipófise que libera hormônio ACTH, levando a estimulação do córtex adrenal. GRs são liberados, exercendo *feedback* negativo sobre o eixo, através do hipocampo e hipotálamo (Iwata, Ota & Duman, 2015).

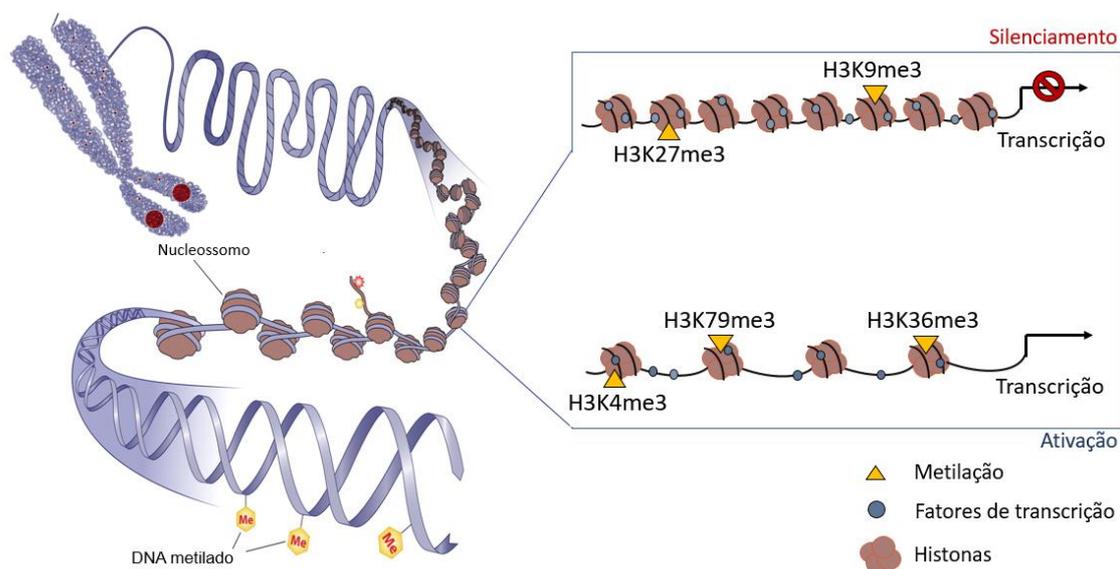


Figura 4: Representação da cromatina e metilações em resíduos específicos. Quando há a metilação dos resíduos K9 e K27 favorecerá a compactação da cromatina silenciando a expressão gênica. Ao contrário acontece quando há a metilação dos resíduos K4, K36 e K79, pois, haverá o favorecimento do relaxamento da cromatina, geralmente promovendo a expressão gênica. Adaptado de: [mcb.asm.org/content/30/20/4758/F1](http://mcb.asm.org/content/30/20/4758/F1).



Figura 5: Ilustração do protocolo de ECMI com os estresses utilizados durante o período de 6 semanas.

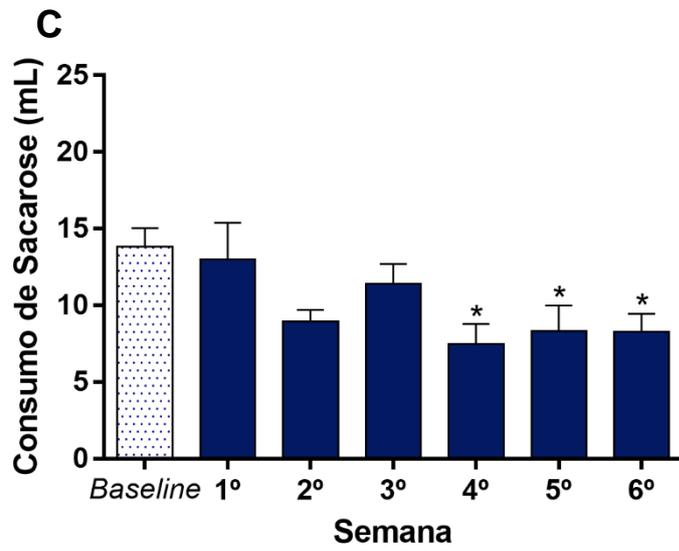
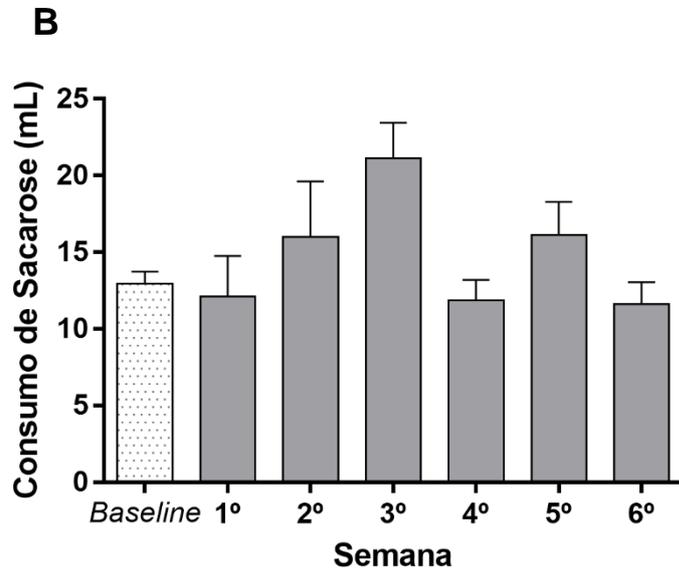
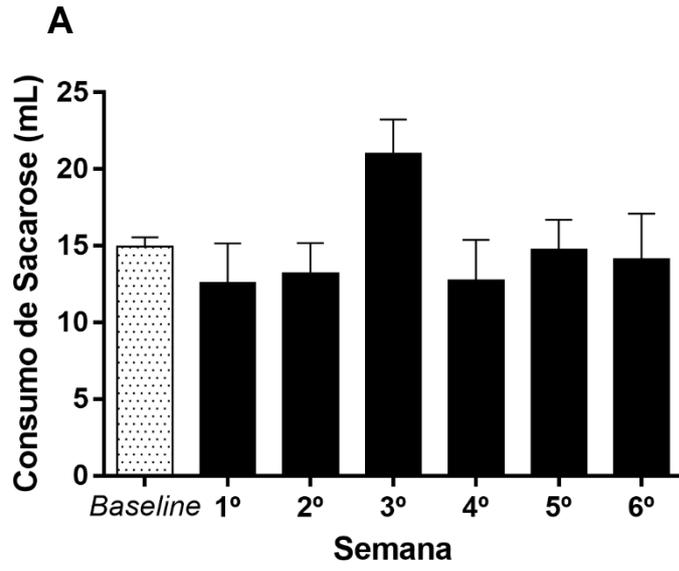


Figura 6: Gráficos demonstrando o consumo de sacarose dos animais a cada semana de estresse para animais (A) controles, (B) resilientes e (C) depressivos. Os dados foram analisados através de ANOVA unidirecional seguido de teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

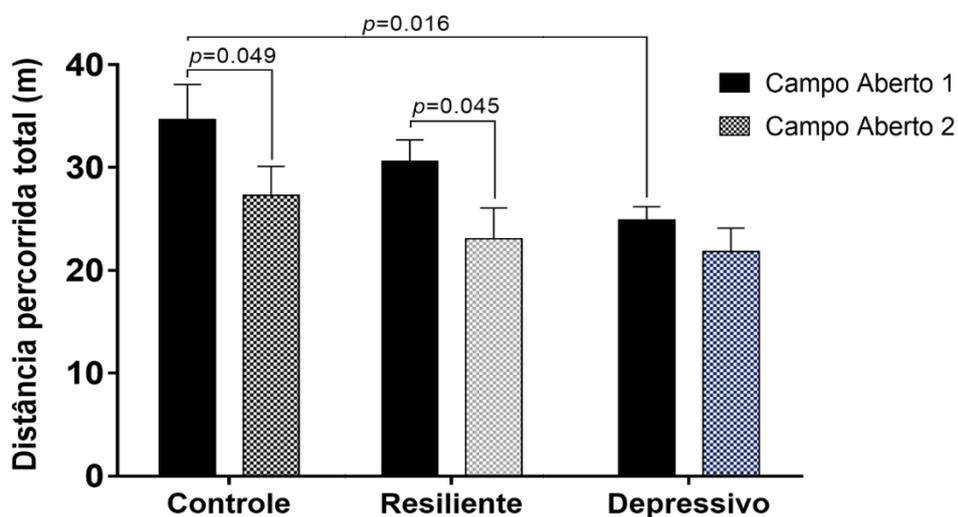
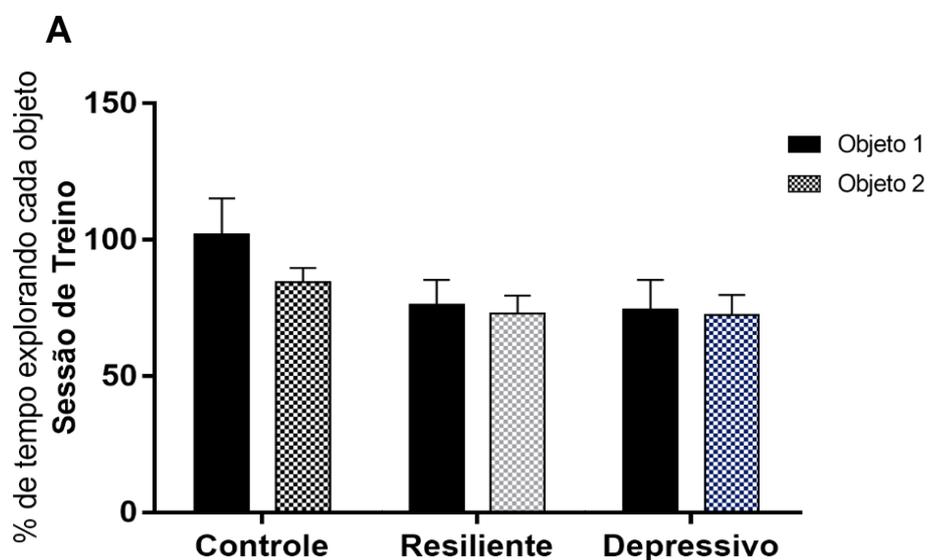


Figura 7: Gráficos de análise mensuração do tempo de exploração de objetos na sessão treino e na sessão teste. Os dados foram analisados através de ANOVA bidirecional, seguido de teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .



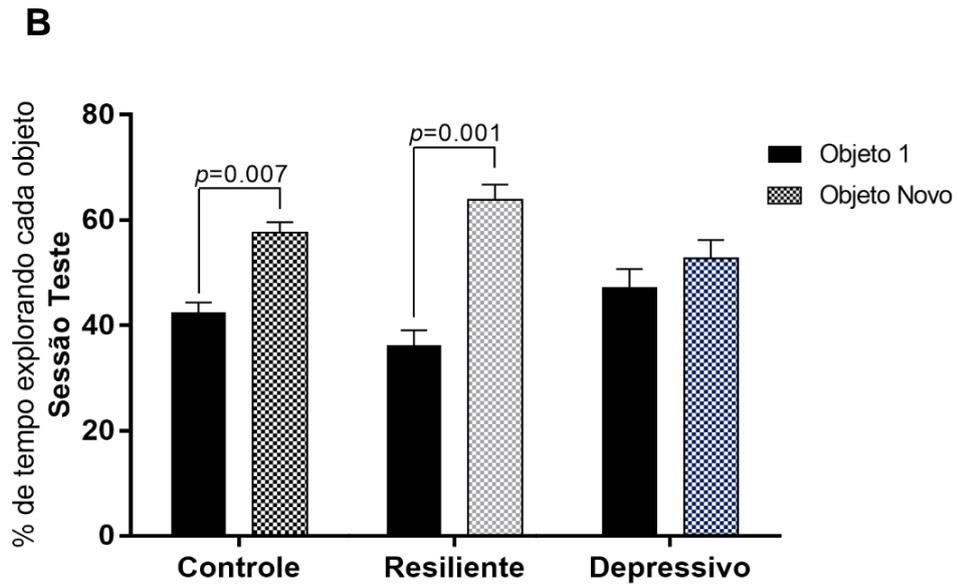


Figura 8: Gráficos de análise do tempo de exploração de objetos na (A) sessão treino e na (B) sessão teste. Os dados foram analisados através de ANOVA bidirecional, seguido de teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$

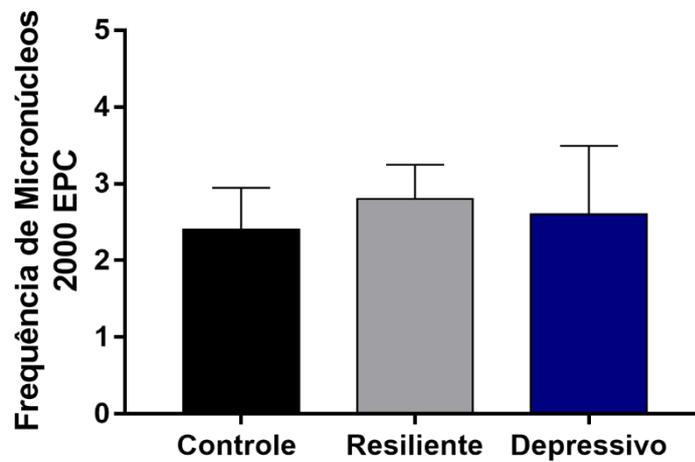


Figura 9: Gráfico da avaliação de presença de micronúcleos nos linfócitos. Análise feita por ANOVA unidirecional seguida de teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

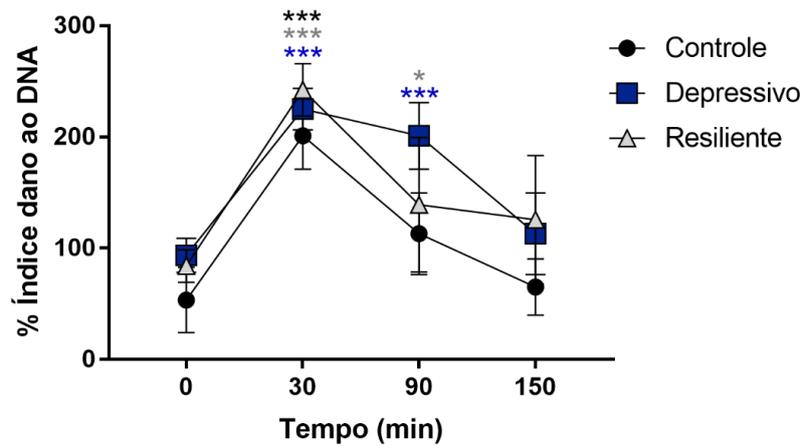


Figura 10: Gráfico da investigação de dano ao DNA em diferentes tempos a partir de um insulto de peróxido de hidrogênio e cinética de reparo. Análise feita por ANOVA unidirecional e teste *post-hoc* de Bonferroni. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

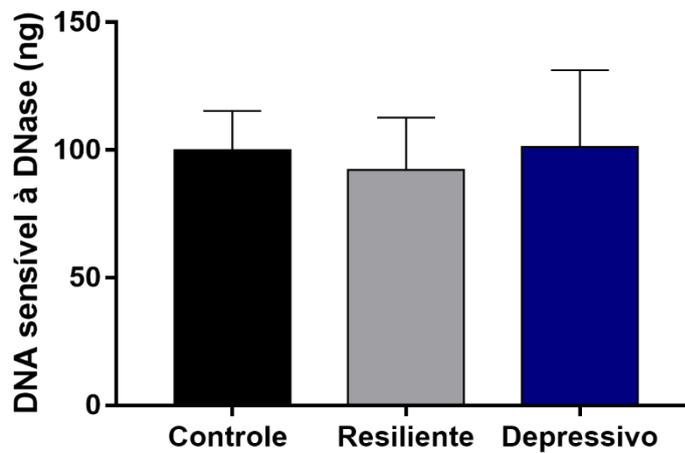


Figura 11: Gráfico demonstrando a concentração de DNA quando exposto à DNase. Análise feita por ANOVA unidirecional e teste *post-hoc* de Tukey.

## Hipotálamo

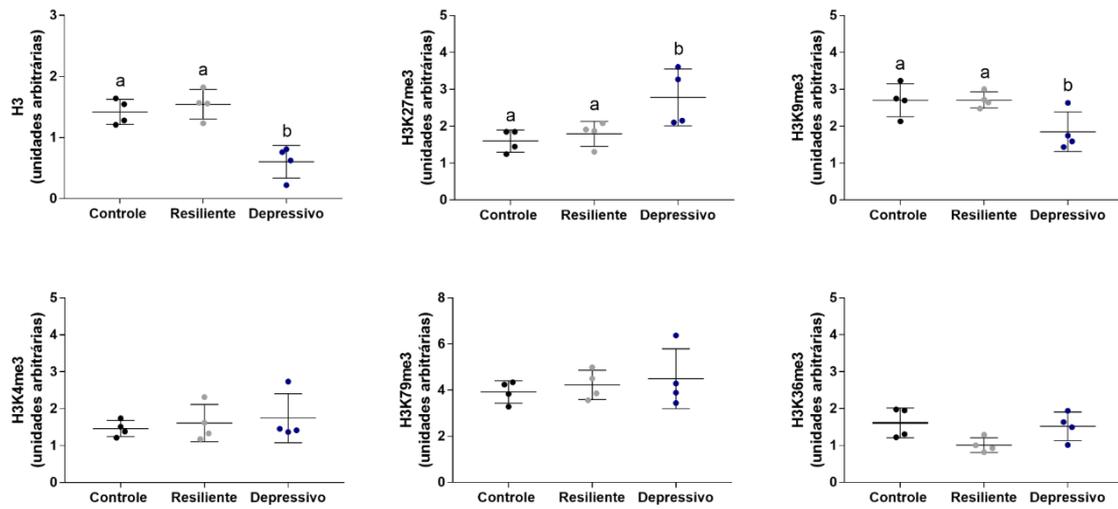


Figura 12: Painel gráfico demonstrando a diferença de metilação da H3 total, H3K27me3, H3K9me3, H3K4me3, H3K79me3 e H3K36me3 no hipotálamo com as fotos representativas do *western blot*. Análise feita por ANOVA bidirecional e teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## Hipocampo

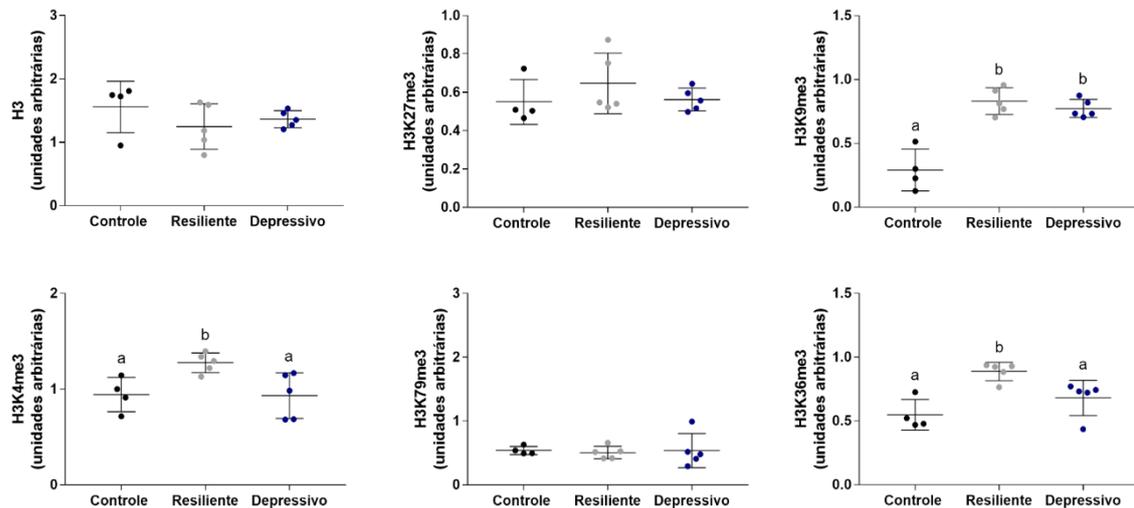


Figura 13: Painel gráfico demonstrando a diferença de metilação da H3 total, H3K27me3, H3K9me3, H3K4me3, H3K79me3 e H3K36me3 no hipocampo com as fotos representativas do *western blot*. Análise feita por ANOVA bidirecional e teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## Córtex total

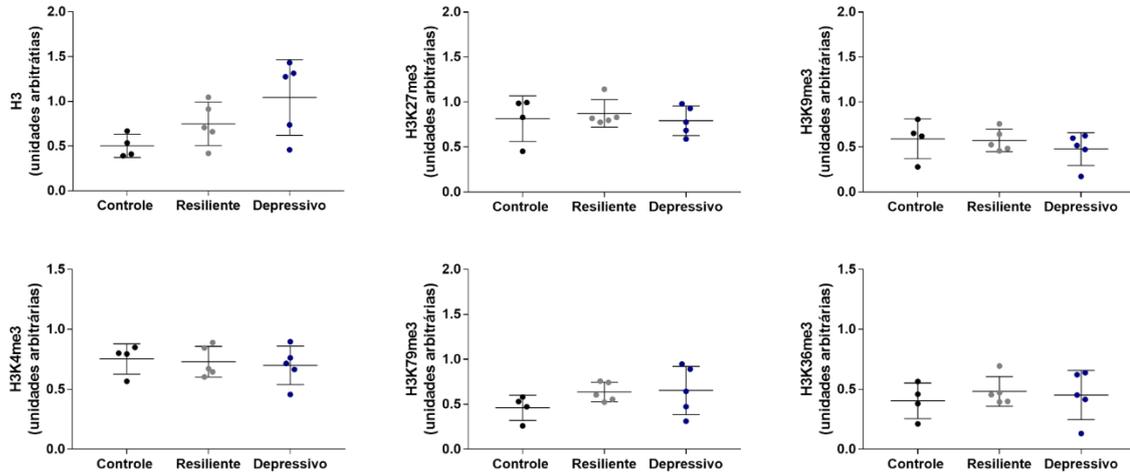


Figura 14: Painel gráfico demonstrando a diferença de metilação da H3 total, H3K27me3, H3K9me3, H3K4me3, H3K79me3 e H3K36me3 no córtex com as fotos representativas do *western blot*. Análise feita por ANOVA bidirecional e teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## Hipocampo

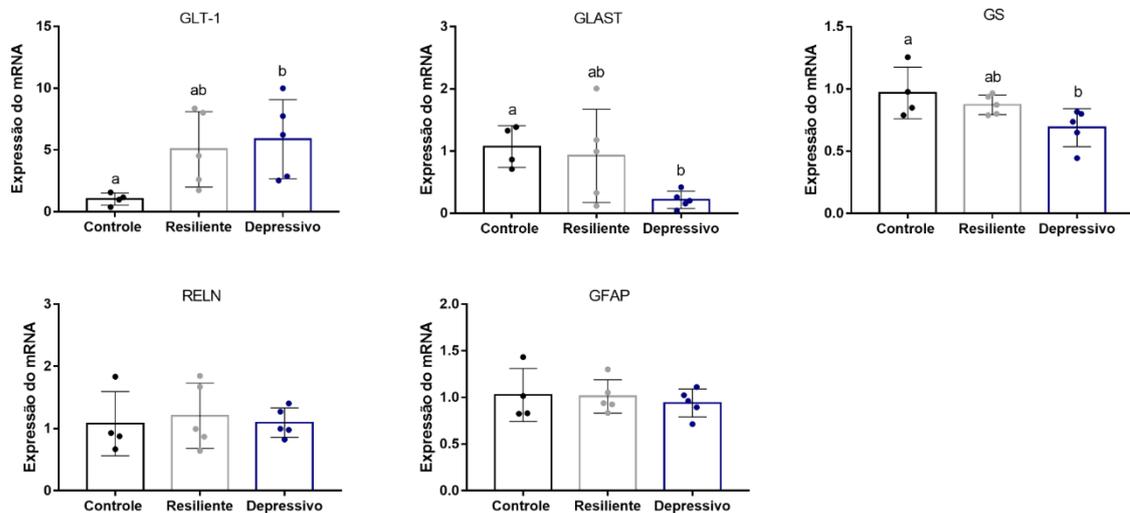


Figura 15: Gráfico demonstrando a expressão dos genes GLT-1, GLAST, GS, RELN e GFAP no hipocampo. Os resultados foram analisados utilizando ANOVA bidirecional e teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## Córtex total

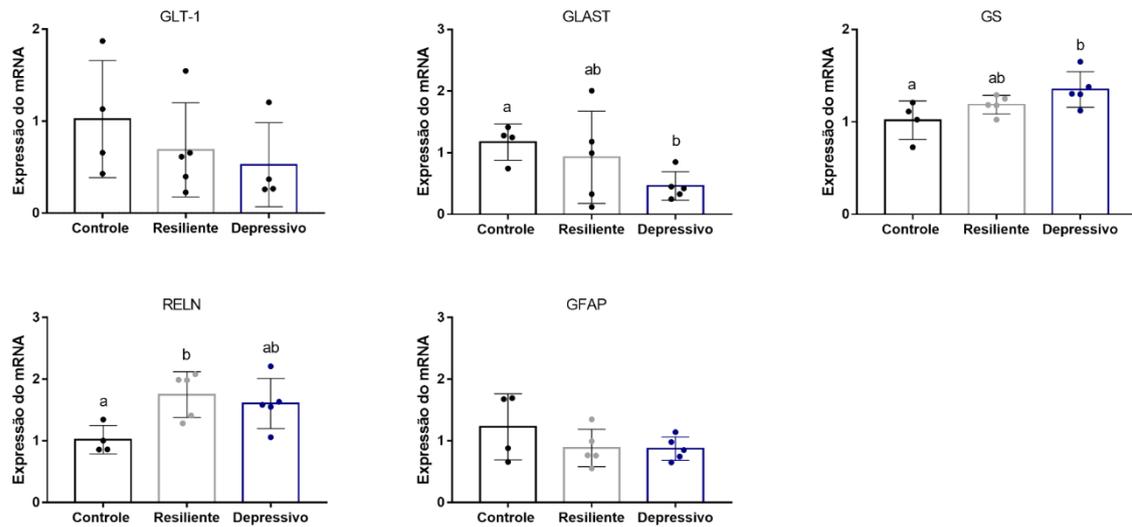


Figura 16: Gráfico demonstrando a expressão dos genes GLT-1, GLAST, GS, RELN e GFAP no córtex. Os resultados foram analisados utilizando ANOVA bidirecional e teste post-hoc de *Tukey*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

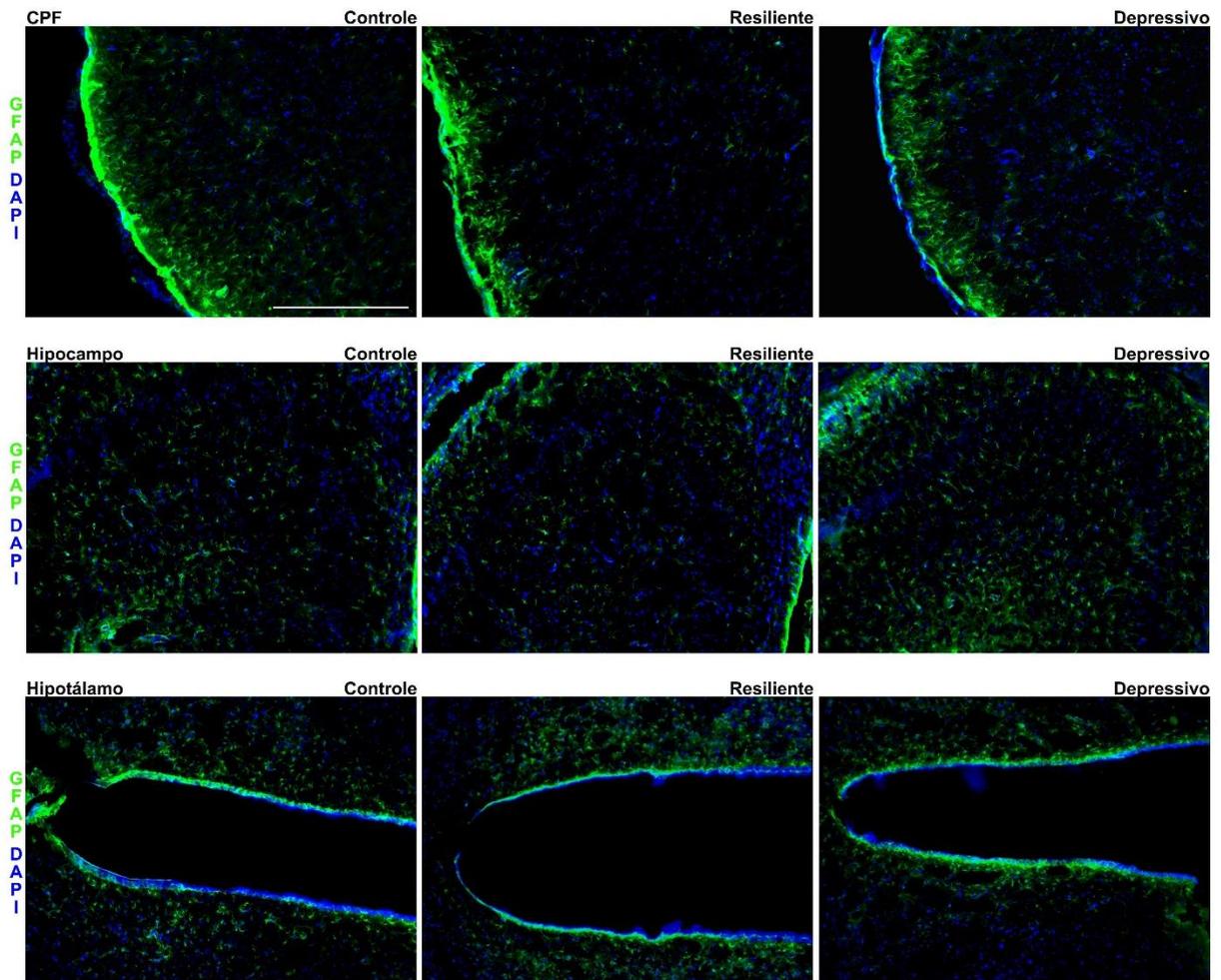
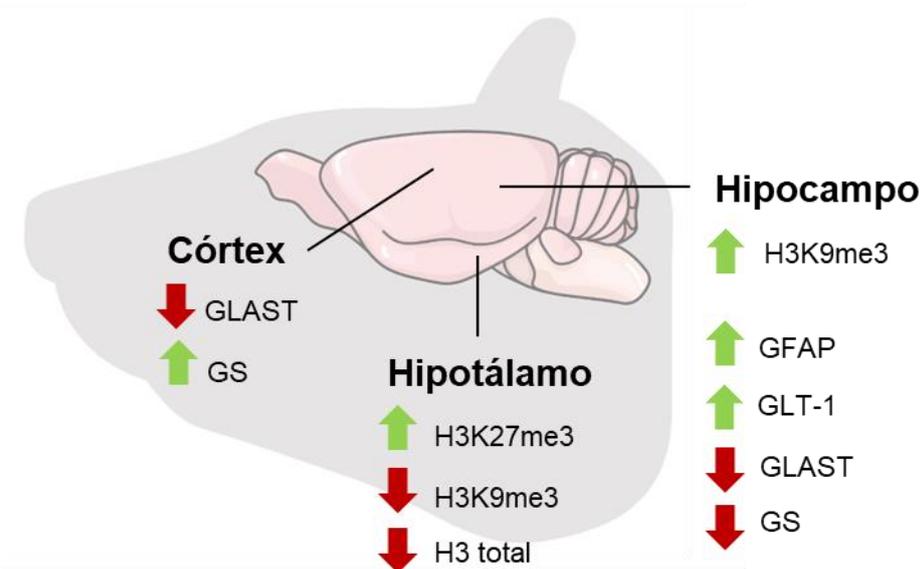


Figura 17: Efeitos do estresse crônico moderado e imprevisível na astrogliose no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (representado pela região CA3) e hipotálamo em ratos. As imagens do ensaio de imunofluorescência foram obtidas com o Microscópio EVOS® FL – Auto Imaging System. Para analisar a imunorreatividade de GFAP, os cortes cerebrais foram incubados com anticorpo anti-GFAP (verde). O corante DAPI (azul) foi usado para marcar o DNA nuclear das células. Barra de escala: 400µm.

## TIPO-DEPRESSIVO



## TIPO-RESILIENTE

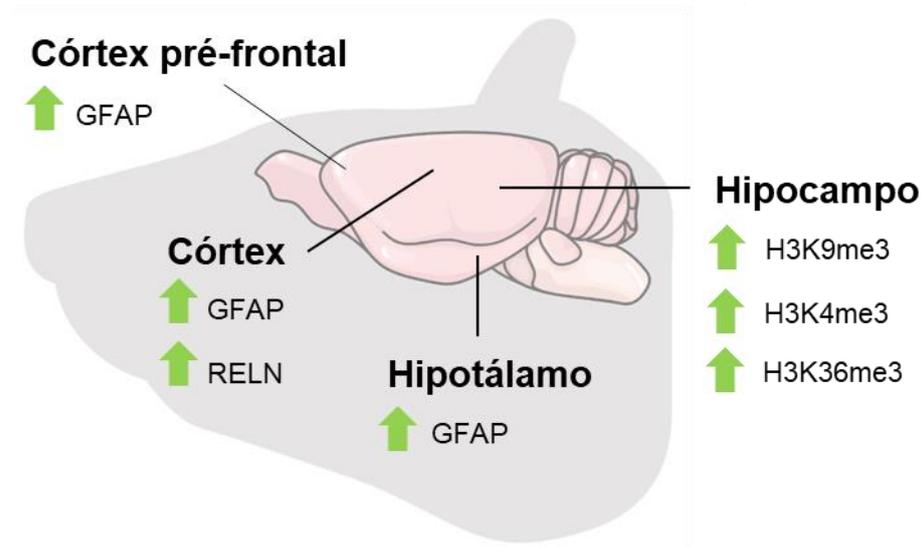


Figura 18: Resumo dos resultados encontrados em entre os animais com fenótipo tipo-depressivo e resilientes.