

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Fernanda Barbisan

**A AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO LÍTIO É INFLUENCIADA POR  
FATORES GENÉTICOS, NUTRICIONAIS E FÁRMACOS  
ANTIDEPRESSIVOS: ESTUDO *IN VITRO***

Santa Maria, RS

2017

**Fernanda Barbisan**

**A AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO LÍTIO É INFLUENCIADA POR FATORES GENÉTICOS, NUTRICIONAIS E FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: ESTUDO *IN VITRO***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutora em Farmacologia**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Coorientador: Dr Pedro Antônio Schmidt do Prado Lima

Santa Maria, RS

2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Barbisan, Fernanda

A AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO LÍTIO É INFLUENCIADA POR FATORES GENÉTICOS, NUTRICIONAIS E FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: ESTUDOS IN VITRO / Fernanda Barbisan.- 2017.

198 p.; 30 cm

Orientador: Ivana Beatrice Manica da Cruz

Coorientador: Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2017

1. Polimorfismo Genético 2. Imunosenescência 3. Inflamação 4. Transtornos do Espectro Bipolar 5. Depressão I. da Cruz, Ivana Beatrice Manica II. do Prado-Lima, Pedro Antônio Schmidt III. Título.

**Fernanda Barbisan**

**A AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO LÍTIO É INFLUENCIADA POR FATORES  
GENÉTICOS, NUTRICIONAIS E FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: ESTUDO *IN  
VITRO***

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Farmacologia, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para  
obtenção do título de **Doutora em  
Farmacologia.**

**Aprovada em 01 de setembro de 2017:**

---

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Dr<sup>a</sup>.  
(Presidente/orientadora)**

---

**Maria Amália Pavanato, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Claudia Giuliano Bica, Dr<sup>a</sup>. (UFCSPA)**

---

**Jacqueline da Costa Escobar Piccoli, Dr<sup>a</sup>. (UNIPAMPA)**

---

**Melissa Orlandin Premaor Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, RS

2017

## **DEDICATÓRIA**

**Ao meu grande incentivador,  
minha inspiração,  
e minha maior saudade,  
meu noninho lindo  
Hermes Antônio Lucca.**

## AGRADECIMENTOS

Ao ser superior que nos guia e protege pelos caminhos da vida.

Ao meu noninho Hermes por todos os ensinamentos, incentivo e pelo exemplo de ser humano que foste, agora podes me chamar de Doutora Fernanda, como tu gostava. Noninho, siga sempre ao meu lado, como tu seguistes até aqui.

Aos meus pais, Ione e Vanderlei, e nona Ana, pelo apoio incondicional, paciência e incentivo, nós sabemos quantas pedras removemos do caminho para chegarmos até aqui.

As minhas tias, que sempre foram muito mais do que isso, pelo apoio, amor, confiança e motivação incondicional.

A minha irmã Daniela e aos meus primos Laura, Gustavo e Augusto Inácio, o amor e a admiração de vocês com certeza foi e é pedra fundamental nesta caminhada.

Enfim, família, obrigada por nunca medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos!

Aos meus anjos de luz Claudinei Ascoli (*in memorian*) e Rafael Gobbato (*in memorian*). Claudinei, obrigada por ainda criança termos feito o pacto do doutorado, por ter sido fundamental na minha vinda a Santa Maria e por estar sempre ao meu lado. Rafa queridão, que saudade de conversar contigo, de ouvir “vai com medo mas vai, brilha muito guria”, sigamos, conto com teu brilho sempre.

A Ivana Beatrice Mânica da Cruz, que foi orientadora, mãe e amiga, só tenho a agradecer, agradecer e agradecer por seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência. Você é um ser humano e uma profissional ímpar não há palavras para agradecer. Obrigada por tudo, e tu sabes o quanto esse tudo é tudo e infinito.

A Verônica Azzolin, docinho, obrigada por estar comigo nos piores momentos e nos melhores também, a vida me deu mais uma irmã, e eu sou grata por isso.

A Marcelle Benatti Eickhoff, por ter sido minha base lá no início, lutamos juntas e estamos colhendo bons frutos.

A Maiquidiele Dal Berto, por todas as conversas, pousos, confidências, senhas e terapias compartilhadas desde 2012, ao Matheus Marcon pelos mates ao vivo ou “via Whats”.

As gurias de Ronda Alta, em especial a Xanda, e as gurias de Xanxerê (meu quarteto fantástico) por me incentivarem a chegar até aqui e pelos tantos anos de amizade.

A Cíntia Corte Real, a Jéssica Mota, Eduardo Andrade, pela torcida e parceria sempre.

A Cibele F. Teixeira, ao Gustavo Cardenas Monteiro, ao Moisés H. Mastella, pelo apoio, amizade, ajuda, pelos inúmeras comidas, dramas e alegrias compartilhadas.

A Andressa Seehaer, a Micheli Jobim, a Thamara Flores, a Neida Pellenz, ao Thiago Duarte, ao Vitor Bueno, a Dianni Capeleto, Ivo Emílio da Cruz Jung e Vitória Azzolin pelas ajudas, amizade e torcida sempre.

A “mamis científica” Marta Duarte, por sempre estar disposta a ajudar, sem pedir nada em troca.

Ao Alencar K. Machado e Eduardo Dornelles por todos os experimentos “vividos”, e bons momentos compartilhados, pela amizade que criamos e que nos incentiva.

A todos os Ics que passaram pela minha trajetória, são muitos, e todos especiais no seu jeitinho obrigada pela convivência por crescermos juntos.

Aos alunos de graduação que tive contato durante os períodos de docência do doutorado, a convivência me fez aprender muito.

A toda equipe Biogenômica, todos vocês foram importantes nessa caminhada e fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal. Charles Assmann e Beatriz Bonadimann pela fundamental ajuda durante o desenvolvimento do 1º artigo.

Aos professores de graduação Marco Aurélio Echart Montano e Glauber Wagner por acreditarem no meu sonho e me propiciarem chegar até o Laboratório de Biogenômica. Glauber obrigada por estar sempre na retaguarda quando a PCR não dava certo, e eu já não sabia mais em que variável mexer.

Ao Professor Paulo Bayard, aos Vitor, Werner, Matheus e toda a equipe Biorep, pela paciência e ajuda sempre que solicitada, por me fazerem sentir “de casa” no Laboratório de vocês.

Ao meu coorientador Pedro Lima, obrigada pelas muitas lições, pelos ensinamentos, por tornar as coisas mais simples, e por me apresentar esse lindo mundo da neuropsiquiatria.

A equipe UnATI, destacando o Dr. Euler Esteves Ribeiro e Dra. Ednea Maia Aguiar Ribeiro, obrigada pelas oportunidades, pelo aprendizado e pelo exemplo de luta incansável.

A bolsa Prouni concedida na Graduação pelo mandato do Presidente Lula, as bolsas de Mestrado e Doutorado e recursos para desenvolvimento dos projetos concedidos pelo mandato da Presidenta Dilma. Obrigada pela possibilidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, e a super secretária Zeli por ser sempre tão prestativa e solucionar todos os problemas.

## EPÍGRAFE

*“É melhor tentar e falhar, que se preocupar e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão, que se sentar fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ...”*  
*Martin Luther King*

*“A gente leva da vida, a vida que a gente leva”*  
*Tom Jobim*



## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Centro de Ciências da Saúde  
Universidade Federal de Santa Maria

### **A AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO LÍTIO É INFLUENCIADA POR FATORES GENÉTICOS, NUTRICIONAIS E FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS: ESTUDOS *IN VITRO***

AUTORA: Fernanda Barbisan  
ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
COORIENTADOR: Dr Pedro Antônio Schmidt do Prado Lima

O envelhecimento populacional aumentou a prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis, incluindo transtornos psiquiátricos como a depressão e transtornos do espectro bipolar (TEBs). Evidências sugerem que tais transtornos estão associadas a processos crônicos de inflamação e estresse oxidativo. O Lítio, é um dos principais fármacos da clínica psiquiátrica, e seu principal mecanismo de ação é anti-inflamatório por inibição da enzima GSK-3 $\beta$ . Entretanto, cerca de 40% dos pacientes não respondem a terapia com Lítio satisfatoriamente. E, essa falta de resposta pode envolver polimorfismos genéticos, ou ainda interação fármaco-alimento, ou fármaco-fármaco. Diante disso, nesse trabalho damos ênfase a ação do polimorfismo Val16Ala-SOD2 que causa desbalanço entre os níveis de Superóxido e peróxido de Hidrogênio e está envolvido com o metabolismo oxidativo e inflamatório. Moléculas bioativas como xantinas e catequinas presentes nos alimentos, que possuem efeito anti-inflamatório e antioxidante, e portanto, as mesmas também poderiam influenciar a resposta farmacológica ao lítio. E a interação lítio- antidepressivos, muitas vezes utilizada em TEBs. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a influência de fatores genéticos, nutricionais e interação farmacológica com antidepressivos na resposta anti-inflamatória do lítio. Três delineamentos experimentais foram conduzidos. O primeiro trabalho avaliou que a influência da resposta anti-inflamatória ao Lítio de células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) através de dois estudos complementares. Inicialmente foi conduzido um estudo que buscou confirmar que tal variação genética poderia causar resposta inflamatória diferenciada avaliando o perfil da imunosenescência destas células. Para tanto, CMSPs foram obtidas de voluntários com diferentes genótipos Val16Ala-SOD2 e foram cultivadas durante 15 passagens celulares (60 dias), em condições padronizadas. A cada passagem as CMSPs foram ativadas com fitohemaglutinina (PHA), um antígeno que desencadeia resposta inflamatória. Cada passagem foi iniciada com uma concentração de  $1 \times 10^5$  células. A taxa de proliferação celular a cada passagem foi determinada via ensaio espectrofotométrico do MTT e, eventualmente pela análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Também foram analisados marcadores pró- inflamatórios e marcadores oxidativos. Realizamos um segundo estudo, que avaliou a influência do polimorfismo Val16Ala-SOD2 na modulação da enzima GSK-3 $\beta$  pelo Lítio através da análise da expressão gênica via qRT-PCR e dos níveis de proteína via imunoenensaio ELISA. Também realizamos análises com a linhagem comercial de macrófagos RAW 264.7, a fim de confirmar os resultados obtidos em CMSPs. Para simular o desbalanço S-HP foi utilizada suplementação das culturas com paraquat gerando células VV-like (com níveis elevados de superóxido) e porfirina gerando células AA-like (com níveis elevados de PH). O segundo protocolo deste trabalho avaliou o potencial efeito isolado e de uma mistura das xantinas e catequina na resposta anti-inflamatória do lítio em macrófagos RAW 264.7, através da análise de marcadores oxidativos e inflamatórios. Por fim, o terceiro protocolo avaliou o efeito da interação entre o Lítio Imipramina, Nortriptilina, Fluoxetina e Escitalopram também utilizando macrófagos RAW 264.7 como modelo experimental. Neste último protocolo, foi criado um índice inflamatório (IF) a fim de agregar os resultados obtidos. A fim de validar o IF, foi conduzida uma análise similar às das células *in vitro*, em um banco de dados com 154 voluntários. Essa análise adicional permitiu avaliar a acurácia do IF e sua potencial similaridade com situações inflamatórias que ocorrem *in vivo*. Nos estudos *in vitro* os resultados foram comparados por análise de variância (de um a ou duas vias, conforme o caso) seguida de *post hoc* de Dunnet, Tukey ou Bonferroni, conforme o caso. No estudo *in vivo* foi realizada uma curva Roc a fim de avaliar se o IF era representativo de um estado inflamatório real. Um padrão de imunosenescência foi observado em todas as culturas até a 15ª passagem, quando ocorreu uma interrupção no ciclo celular na fase G0/G1. Entretanto, antes disso, a partir da 10ª passagem celular, ocorreu um estado de hiperativação inflamatória com altas taxas de proliferação celular e aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias e dos marcadores oxidativos. Apesar deste padrão geral, CMSPs AA apresentaram maior intensidade na resposta

inflamatória inicial, enquanto que CMSPs VV tenderam a manter por mais tempo a resposta inflamatória. Portanto, o conjunto destes resultados corroborou a sugestão de que o desbalanço S-PH tem influência direta na modulação da inflamação. O segundo estudo do primeiro protocolo observou que, o desbalanço S-PH, tanto geneticamente determinado pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2 quanto farmacologicamente induzido influenciou a resposta anti-inflamatória do Lítio via modulação da enzima GSK-3 $\beta$ . O desbalanço induziu um efeito anti-inflamatório mais intenso do Lítio em células AA ou AA-like. No segundo protocolo, que avaliou o efeito de fatores nutricionais na ação anti-inflamatória do Lítio, especialmente a mistura de xantinas-catequina intensificou a resposta anti-inflamatória do Lítio via diminuição nos níveis das citocinas pró-inflamatórias, aumento nos níveis da IL-10 e diminuição de marcadores oxidativos. Por fim, o último protocolo investigou a influência da interação entre o Lítio e os antidepressivos. O IF foi validado via análise da curva ROC mostrou que o IF é um índice acurado em relação a inflamação com uma área sobre a curva (AUC) de 0,803 (intervalo de confiança a 95% de 0,715-0,890). Valores do IF  $\geq$  2,0 em relação a níveis de Proteína C Reativa  $>$  0,6  $\mu$ g/mL apresentaram uma sensibilidade de 0,915 e especificidade de 0,486. Já a interação com antidepressivos, mostrou que quando o Lítio está associado a Imipramina, ou Nortriptilina ou Fluoxetina, ocorre uma intensificação do efeito anti-inflamação, com uma diminuição do IF, entretanto a associação com o Escitalopram induz a efeitos pró-inflamatórios, com um aumento no IF indicando efeito pró-inflamatório desta interação. Em síntese, apesar das limitações metodológicas relacionadas aos estudos *in vitro*, o conjunto dos resultados confirmou que o Lítio possui efeito anti-inflamatório importante, mas que este efeito não é universal, uma vez que ela pode ser influenciado por fatores genéticos, nutricionais e mesmo pela interação com fármacos antidepressivos. Esses resultados podem ser relevantes na clínica psiquiátrica.

**Palavras-Chave:** Polimorfismo Genético. Imunosenescência. Xantinas. Catequinas. Inflamação. Estresse oxidativo. Depressão. Transtornos do Espectro Bipolar.

## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Centro de Ciências da Saúde  
Universidade Federal de Santa Maria

### **ANTIINFLAMMATORY ACTION OF LITHIUM IS INFLUENCED BY GENETIC, NUTRITIONAL AND ANTIDEPRESSANT DRUGS: IN VITRO STUDIES**

AUTHOR: Fernanda Barbisan  
ADVISOR: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz  
CO-ADVISOR: Dr. Pedro Antônio Schmidt do Prado Lima

Population aging has increased the prevalence of chronic non-communicable diseases, including psychiatric disorders such as depression and bipolar spectrum disorders (BSDs). Evidence suggests that such disorders are associated with chronic processes of inflammation and oxidative stress. Lithium is one of the main drugs of the psychiatric clinic, and its main mechanism of action is anti-inflammatory by inhibition of the enzyme GSK-3 $\beta$ . However, about 40% of patients do not respond satisfactorily to Lithium therapy. And, this absence of response may involve genetic polymorphisms, or even drug-food interaction, or drug-drug, since lithium is often associated with antidepressants or antipsychotics. Therefore, in this work we emphasize the action of the polymorphism Val16Ala-SOD2 which causes imbalance between the levels of Superoxide and Hydrogen Peroxide and is involved with oxidative and inflammatory metabolism. Bioactive molecules such as xanthines and catechins present in foods, which have an anti-inflammatory and antioxidant effect, and therefore, they could also influence the pharmacological response to lithium and the interaction lithium-antidepressants, often used in TEBs. To evaluate in vitro the influence of genetic and nutritional factors and pharmacological interaction with antidepressants on the anti-inflammatory response of lithium. Three experimental designs were conducted. The first work evaluated the influence of the anti-inflammatory response to the Lithium of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) through two complementary studies. Initially, a study was conducted to confirm that such genetic variation could cause a differentiated inflammatory response evaluating the immunosenescence profile of these cells. Therefore, PBMCs were obtained from volunteers with different Val16Ala-SOD2 genotypes and were cultured for 15 cell passages (60 days) under standardized conditions. At each passage the PBMCs were activated with phytohemagglutinin (PHA), an antigen that triggers inflammatory response. At each passage the PBMCs were activated with phytohemagglutinin (PHA), an antigen that triggers inflammatory response. Each passage was started at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells. The rate of cell proliferation at each passage was determined via MTT spectrophotometric assay and, eventually, by cell cycle analysis by flow cytometry. Pro-inflammatory markers and oxidative markers were also analyzed. We performed a second study, which evaluated the influence of the Val16Ala-SOD2 polymorphism on the modulation of the GSK-3 $\beta$  enzyme by Lithium through the analysis of the gene expression via qRT-PCR and the levels of protein via immunoassay ELISA. We also performed analyzes with the RAW 264.7 macrophages commercial lineage in order to confirm the results obtained in PBMCs. Supplementation of cultures with paraquat to generate VV-like cells (with high levels of superoxide) was used to simulate the S-HP imbalance And porphyrin generating AA-like cells (with elevated PH levels). The second protocol of this work evaluated the potential isolated effect and a mixture of the xanthines and catechins in the anti-inflammatory response of lithium in macrophages RAW 264.7, through the analysis of oxidative and inflammatory markers. Finally, the third protocol evaluated the effect of the interaction between Lithium, Imipramine, Nortriptyline, Fluoxetine and Escitalopram also using RAW 264.7 macrophages as an experimental model. In this latter protocol, an inflammatory index (II) was created in order to aggregate the results obtained. In order to validate the II, a similar analysis was performed to the cells in vitro, in a database of 154 volunteers. This additional analysis allowed to evaluate the accuracy of the II and its potential similarity with inflammatory situations that occur in vivo. In in vitro studies the results were compared by analysis of variance (one-way or two-way, as appropriate) followed by post hoc Dunnet, Tukey or Bonferroni, according to the case. In the in vivo study, a Roc curve was performed to assess whether IF was representative of an actual inflammatory condition. A pattern of immunosenescence was observed in all cultures up to the 15th passage, when there was an interruption in the cell cycle in the G0 / G1 phase. However, prior to that, from the 10th cell passage, there was a state of inflammatory hyperactivation with high rates of cell proliferation and increased levels of proinflammatory cytokines and oxidative markers. Despite this general pattern, AA PBMCs showed greater intensity in the initial inflammatory response, whereas VV PBMCs tended to maintain the inflammatory response longer. Therefore, the set of these

results corroborated the suggestion that the S-PH imbalance has a direct influence on the modulation of inflammation. The second study of the first protocol observed that the S-PH imbalance, both genetically determined by the Val16Ala-SOD2 polymorphism and pharmacologically induced influenced the anti-inflammatory response of the Lithium-modulating GSK-3 $\beta$  enzyme. Imbalance induced a more intense anti-inflammatory effect of lithium on AA or AA-like cells. In the second protocol, which evaluated the effect of nutritional factors on the anti-inflammatory action of lithium, especially the mixture of xanthines-catechins intensified the anti-inflammatory response of Lithium via decrease in the levels of pro-inflammatory cytokines, increase in IL-10 levels and decrease in oxidative markers. Finally, the last protocol investigated the influence of the interaction between lithium and antidepressants. The II was validated via analysis of the ROC curve showed that the II is an accurate index in relation to the inflammation with an area on the curve (AUC) of 0.803 (95% confidence interval of 0.715-0.890). Values of II > 2.0 relative to Reactive Protein C levels > 0.6  $\mu\text{g} / \text{mL}$  had a sensitivity of 0.915 and specificity of 0.486. Interaction with antidepressants has shown that when Lithium is associated with Imipramine, or Nortriptyline or Fluoxetine, there is an intensification of the anti-inflammatory effect, with a decrease in the II, However, the association with Escitalopram induces pro-inflammatory effects, with an increase in IF indicating the proinflammatory effect of this interaction. In summary, despite the methodological limitations related to the in vitro studies, the set of results confirmed that Lithium has an important anti-inflammatory effect, but that this effect is not universal since it can be influenced by genetic, nutritional factors and even by interaction with antidepressant drugs. These results may be relevant in the psychiatric clinic.

**Keywords:** Genetic polymorphism. Immunosenescence. Xanthines. Catechins. Inflammation. Oxidative stress. Depression. Bipolar Disorders.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b> - Critérios para diagnóstico de episódio depressivo.....	22
<b>Figura 1</b> - Disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica.....	25
<b>Figura 2</b> - Rota sinalizadora do possível efeito antidepressivo do BDNF.....	26
<b>Figura 3</b> - Hipótese das Citocinas: representação da via das quinureninas.....	28
<b>Figura 4</b> - Representação de um indivíduo bipolar demonstrando uma gama de mudanças de humor desde a depressão até a mania.....	30
<b>Figura 5</b> - Citocinas secretadas por macrófagos ativados.....	34
<b>Figura 6</b> - Polarização de macrófagos.....	35
<b>Figura 7</b> - Eixo HPA e processo inflamatório.....	36
<b>Figura 8</b> - Produção de energia metabólica e metabólitos oxidativos (EROS) na mitocôndria.....	41
<b>Figura 9</b> - Interface entre inflamação, estresse oxidativo dano e disfunções s no reparo de DNA no contexto da depressão.....	43
<b>Figura 10</b> - Principais ações moleculares do Lítio via inibição de GSK-3 $\beta$ .....	50
<b>Figura 11</b> - TLR induz a ativação de múltiplas vias que medeiam respostas pró-inflamatórias.....	52
<b>Figura 12</b> - Da codificação a ativação da enzima SOD2.....	55
<b>Figura 13</b> - Polimorfismo genético Val16Ala-SOD2.....	56
<b>Figura 14</b> - Representação esquemática reações bioquímicas genótipo AA.....	57
<b>Figura 15</b> - Representação esquemática reações bioquímicas genótipo VV.....	58
<b>Figura 16</b> - Guaraná.....	61
<b>Figura 17</b> - Delineamento experimental geral do artigo 1:.....	68
<b>Figura 18</b> - Delineamento experimental geral do artigo 2:.....	70
<b>Figura 19</b> - Delineamento experimental geral do artigo 3:.....	72
<b>Figura 20</b> - Delineamento experimental geral do artigo 4-.....	74

### Figuras do Artigo 1

<b>Figura 1</b> - Características gerais das culturas celulares obtidas a partir de indivíduos adultos saudáveis, portadores dos diferentes genótipos Val16Ala-SOD2, apresentam um desbalanço basal de superóxido-peróxido de hidrogênio (S-PH).....	82
<b>Figura 2</b> - Comparação de alguns indicadores de imunossenescência de culturas celulares de CMSPs com diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2 (AA, VV e AV).....	83
<b>Figura 3</b> - Citometria de fluxo, marcação por Anexina e Iodeto de Propídeo, representando eventos apoptóticos nas diferentes passagens das culturas celulares (0, 8 e 15) obtidas de células mononucleares com os genótipos Val16Ala-SOD2.....	84
<b>Figura 4</b> - Comparação de indicadores inflamatórios entre as passagens de culturas celulares obtidas dos diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2.....	85
<b>Figura 5</b> - Comparação de marcadores oxidativos entre culturas celulares obtidas de portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2.....	86

### Figuras do Artigo 2

<b>Figura 1</b> - Desenho experimental geral dos procedimentos desenvolvidos para avaliar o impacto do desequilíbrio de S-PH nos efeitos inibitórios do Lítio sobre a GSK-3 $\beta$ .....	102
---	-----

<b>Figura 2-</b> Comparação da modulação do gene GSK-3 $\beta$ em CMSPs expostas a diferentes concentrações de Lítio.....	106
<b>Figura 3-</b> Modulação da expressão do gene GSK-3 $\beta$ .....	107
<b>Figure 4-</b> Comparação dos níveis proteicos de GSK-3 $\beta$ em CMSPs com diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2.....	108
<b>Figura 5-</b> Efeito de diferentes concentrações do paraquat (A) e porfirina (B) em linhagem celular de macrófagos.....	109
<b>Figura 6-</b> Efeito do Lítio na GSK-3 $\beta$ gene e proteína em macrófagos com desbalanço S-HP induzido farmacologicamente.....	109
<b>Figura 7-</b> Comparação entre a resposta inflamatória desencadeada pela exposição a PHA em culturas de células de macrófagos RAW e efeito anti-inflamatório de Lítio considerando o desequilíbrio de S-HP obtido a partir do tratamento com paraquat (células semelhantes a VV) e porfirina (células semelhantes a AA).....	110
<b>Figura 8-</b> Esquema geral demonstrando os efeitos inibitórios do lítio na GSK-3 $\beta$ .....	114

### Figuras do Artigo 3

<b>Figure 1-</b> Curva de concentrações com lítio, e moléculas isoladas de xantinas e catequinas e mistura de xantinas e catequinas em macrófagos tratados por 72 horas.....	123
<b>Figure 2-</b> Ciclo celular de macrófagos ativados tratados por 72 com lítio, xantinas/catequinas.....	124
<b>Figure 3-</b> Comparação de marcadores do metabolismo oxidativo entre macrófagos ativados com PHA, e tratados com lítio, e xantina/catequina após 72 horas de exposição.....	126
<b>Figure 4-</b> Comparação dos níveis de citocinas e expressão gênica de citocinas e GSK-3 $\beta$ entre macrófagos ativados com PHA, e tratados com lítio, e xantina/catequina após 72 h de exposição.....	128

### Figuras do Artigo 4

<b>Figura 1-</b> Lítio e fármacos antidepressivos (Imipramina, Nortriptilina, Fluoxetina e Escitalopram) efeito em macrófagos RAW em 24 horas de cultura celular.....	142
<b>Figura 2-</b> Efeito do Lítio e fármacos antidepressivos na proliferação celular de macrófagos RAW 264.7 (72 horas de cultura celular) medido via ensaio MTT.....	144
<b>Figura 3-</b> Efeito do Lítio e fármacos antidepressivos no ciclo celular de macrófagos avaliado através de citometria de fluxo.....	145
<b>Figura 4-</b> Efeito do Lítio e fármacos antidepressivos em culturas celulares de macrófagos RAW 264.7 após 72 horas, em 3 marcadores oxidativos.....	147
<b>Figura 5-</b> - Efeito do Lítio e fármacos antidepressivos em culturas celulares de macrófagos RAW 264.7 após 72 horas, em 4 citocinas.....	149
<b>Figura 6-</b> Comparação do Índice Inflamatório.....	151
<b>Figura 7-</b> Análise de valores do Índice Inflamatório em seres humanos.....	153
<b>Figura 8-</b> Esquema com os principais resultados associados ao efeito da interação do Lítio com 4 fármacos antidepressivos.....	156

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**5-HIAA:** Ácido 5-hidroxiindolacético  
**AA:** Alanina alanina  
**ADTs:** Antidepressivos tricíclicos  
**Ala-SOD2:** Alanina- superóxido dismutase dois  
**ASC:** do inglês, *Apoptosis-associated speck-like protein*  
**ATP:** Adenosina trifosfato  
**AV:** Alanina valina  
**BDNF:** do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*  
**C:** Citosina  
**CAT:** Catalase  
**CID:** Classificação internacional de doenças  
**ConLIGEN:** do inglês, *International Consortium on Lithium Genetics*  
**COX-II:** Ciclo oxigenase dois  
**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementar  
**cAMP:** Adenosina 3',5'-monofosfato cíclica  
**CMSP:** Células Mononucleares do Sangue Periférico  
**CREB:** do inglês, *cAMP response element binding*  
**DAMPs:** do inglês, *Damage-associated molecular patterns*  
**DCFH-DA:** 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato  
**DNA:** Ácido desoxirribonucleico  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DSM-V:** do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual fifth- edition*  
**EROs:** Espécies reativas de oxigênio  
**EUA:** Estados Unidos da América  
**FADH<sub>2</sub>:** Dinucleótido de flavina e adenina  
**FLX:** Fluoxetina  
**GCT:** Aminoácido alanina  
**GSK-3β:** Glicogênio sintase quinase três beta  
**GPX:** Glutaciona peroxidase  
**GTT:** Aminoácido valina  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio  
**HPA:** Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal  
**HPLC:** Cromatografia líquida de alta eficiência  
**IMAO:** Inibidores de monoamina oxidase  
**IL-1β:** Interleucina um beta  
**IL-6:** Interleucina seis  
**IL-10:** Interleucina dez  
**IL-12:** Interleucina doze  
**IL-18:** Interleucina dezoito  
**IF:** Índice inflamatório  
**IFNγ:** Interferon gama  
**IMC:** Índice de massa corporal  
**IMI:** Imipramina  
**ISRS:** Inibidores seletivos da recaptação de serotonina  
**iNOS:** Óxido nítrico induzível.  
**Li:** Lítio  
**O<sub>2</sub>·:** Superóxido  
**OH·:** Radical hidroxila

**ONU:** Organização das Nações Unidas  
**M1:** Macrófagos da rota inflamatória clássica  
**M2:** Macrófagos da rota inflamatória alternativa  
**MAO:** Monoamina oxidase  
**MAPK:** do inglês, *Mitogen activated protein kinases*  
**MDA:** Malondialdeído  
**mEq:** Miliequivalentes  
**MTS:** do inglês, *Mitochondrial target sequence*  
**NADH:** Dinucleótido de nicotinamida e adenina  
**NBT:** Nitro blue tetrazolium  
**NFK $\beta$ :** Fator nuclear kappa beta  
**NK:** do inglês, *Natural Killers*  
**NLRs:** Receptores tipo ligação de nucleotídeo  
**NMDA:** N-metil D-Aspartato  
**NOR:** Nortriptilina  
**ON:** Óxido nítrico  
**PAMPs:** do inglês, *Pathogen associated molecular pattern*  
**PARP-1:** Polimerase um  
**PCR:** Proteína -C- reativa  
**PH:** Peróxido de hidrogênio  
**PHA:** Fitohemaglutinina  
**PI:** Iodeto de propídeo  
**PRRs:** do inglês, *Pattern recognition receptors*  
**qRT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
**RNA:** Ácido ribonucleico  
**S:** Superóxido  
**SCZ:** Esquizofrenia  
**SOD:** Superóxido dismutase  
**SNP:** Single nucleotide polymorphism  
**SUS:** Sistema único de saúde  
**TBARS:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
**TGF $\beta$ :** do inglês, *Transforming growth factor-beta*  
**TEBs:** Transtornos do espectro bipolar  
**Th 1:** do inglês, *T helper cell*  
**TLRs:** Receptores do tipo Toll  
**TRP:** Triptofano  
**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa  
**Val-SOD2:** Valina superóxido dismutase dois  
**WMHS:** do inglês, *World Mental Health Survey*  
**XC:** Xantinas-Catequina



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E SEU IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO.....	19
1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS .....	19
1.3 EPIDEMIOLOGIA E PATOFISIOLOGIA DA DEPRESSÃO.....	21
<b>1.3.1 Neurobiologia e possíveis mecanismos fisiopatológicos da depressão .....</b>	<b>23</b>
1.4 EPIDEMIOLOGIA E PATOFISIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DO ESPECTRO BIPOLAR .....	29
<b>1.4.1 Patofisiologia dos TEBs.....</b>	<b>31</b>
1.5 O PAPEL DA ALTERAÇÃO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIA NOS TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS .....	32
<b>1.5.1 Inflamação.....</b>	<b>32</b>
<b>1.5.2 Função mitocondrial, metabolismo oxidativo e inflamação .....</b>	<b>38</b>
1.6 INTERFACE ENTRE INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E DEPRESSÃO.....	41
1.7 INFLUÊNCIA GENÉTICA ASSOCIADA A DESBALANÇOS OXIDATIVO- INFLAMATÓRIOS .....	44
1.8 FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS E MODULADORES DO HUMOR .....	44
<b>1.8.1 Antidepressivos .....</b>	<b>44</b>
<b>1.8.2 Estabilizadores de Humor .....</b>	<b>47</b>
<b>1.8.2.1 Lítio.....</b>	<b>47</b>
1.9 ATUAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS NO METABOLISMO OXIDATIVO- INFLAMATÓRIO.....	48
<b>1.9.1 Efeito do lítio no metabolismo inflamatório.....</b>	<b>49</b>
1.10 POTENCIAL INFLUÊNCIA DE FATORES GENÉTICOS, DIETÉTICOS E FARMACOLÓGICOS NA AÇÃO ANTIINFLAMATORIA DO LÍTIO.....	53
<b>1.10.1 Fatores genéticos: polimorfismo Val16Ala-SOD2.....</b>	<b>53</b>
<b>1.10.2 Fatores dietéticos: bebidas ricas em xantinas-catequinas.....</b>	<b>59</b>
<b>1.10.3 Fatores farmacológicos.....</b>	<b>63</b>
1.11 HIPÓTESE DO ESTUDO.....	65

<b>2 OBJETIVOS</b> .....	66
2.1 OBJETIVO GERAL .....	66
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
<b>3 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL</b> .....	67
3.4 DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 4:.....	72
<b>4 RESULTADOS</b> .....	75
4.1 ARTIGO 1.....	75
4.2 ARTIGO 2.....	97
4.3 ARTIGO 3.....	116
4.4 ARTIGO 4.....	135
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	164
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	172
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	173
<b>ANEXO A- COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO ARTIGO 1</b> .....	195
<b>ANEXO B- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 3</b> .....	196
<b>ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 4</b> .....	197
<b>ANEXO D- ARTIGO PUBLICADO COMO 1º AUTOR DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO, NÃO RELACIONADO A TESE</b> .....	198

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E SEU IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO

O atual ritmo de envelhecimento da população mundial foi caracterizado pela ONU (Organização das Nações Unidas) em 2015 como: sem precedentes, penetrante, por ser um fenômeno que afeta todos os países, duradouro, já que não será possível o retorno para uma população predominantemente jovem como existia nos tempos em que nossos ancestrais viveram. Este aumento de idosos na população, é consequência direta da diminuição das taxas de fecundidade (número de filhos por mulher) e da mortalidade infantil, que faz com que, cada vez mais existam pessoas adultas e idosas.

No Brasil a população que na década de 90 era predominantemente jovem, está sendo significativamente alterada para pessoas com mais de 60 anos de idade (MIRANDA et al., 2016). De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) divulgados em 2013, a população com faixa etária superior aos 65 anos deve quadruplicar até 2060 alcançando 58,4 milhões (26,7% do total de brasileiros), sendo que a expectativa média de vida deverá aumentar de 75 para 81 anos. Portanto, estima-se que a expectativa de vida global deva saltar dos atuais 68,6 anos para 76,2 anos em 2050.

O fato de as pessoas estarem vivendo mais tempo, não significa necessariamente que elas estejam vivendo de forma mais saudável e com maior qualidade de vida na sua velhice. Isso porque, com a idade aumentam os riscos de aparecimento de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs), incluindo as neuropsiquiátricas que possuem grande impacto para o indivíduo, família e entorno social. Este é o caso da depressão, que é uma das doenças que possui alta prevalência na população idosa, e que atua sob um efeito cascata aumentando a carga de morbi-mortalidade enquanto que diminui a qualidade de vida dos seus portadores (ONU, 2015).

### 1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS

As doenças neuropsiquiátricas afetam cerca de 450 milhões de pessoas em todo mundo. São responsáveis por 30% de todas as doenças não transmissíveis e 14% do total de doenças. Os transtornos neuropsiquiátricos são a causa de aproximadamente 25% da incapacidade

relacionada ao trabalho e ao convívio social. Em adultos jovens, a prevalência é oito vezes superior às doenças cardíacas e vinte vezes superior ao câncer (SOUZA, 2013).

Estima-se que a prevalência das doenças neuropsiquiátricas continuará a aumentar nos próximos anos, em especial em grandes centros urbanos, em função de diferentes fatores estressores que essas populações estão sujeitas. Assim, estima-se que em 2030 a depressão será a segunda causa na carga global de doenças (SOUZA, 2013; WHO, 2016).

Dentre os transtornos neuropsiquiátricos mais frequentemente diagnosticados, podemos citar os transtornos do espectro bipolar (TEBs), esquizofrenia (SCZ) e a depressão (WHO, 2016).

É fundamental comentar que há uma grande falha mundial na coleta de dados sobre saúde mental, especialmente por não se tratarem de doenças de notificação compulsória. Apesar de alguns esforços estarem sendo feitos para fortalecer a pesquisa internacional nessa área, dados epidemiológicos confiáveis estão ausentes para a maioria da população do mundo (BAXTER, 2013).

Baxter (2013) mostrou que para 64% da população mundial não há dados sobre a prevalência de transtornos mentais. Diferentemente da Austrália e da América do Norte (Estados Unidos da América [EUA] e Canadá), onde os sistemas de coleta de informação abrangem cerca de 75% da população entre 18 e 80 anos, nos países da Ásia, da América Latina e da Europa Central e Oriental, os dados são escassos ou ineficientes. Com isso, pode-se dizer que na maioria dos países os transtornos mentais permanecem “invisíveis” e, conseqüentemente, não há desenvolvimento de políticas públicas de saúde que visem orientar e dar assistência a portadores e suas famílias (PRINCE et al., 2007).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde (2008), apontam que 3% da população brasileira sofre de algum tipo de transtorno mental grave e persistente, 6% apresenta transtornos psiquiátricos graves decorrentes do uso de álcool e outras drogas, e 12% necessita de algum atendimento de saúde seja ele contínuo ou eventual, ao longo da sua vida. Além disso, 5,8 % da população brasileira tem diagnóstico de depressão, e todos os anos são notificados 10 mil casos de suicídio, dos quais cerca de 90% desses casos estão relacionados com depressão grave (WHO, 2017).

Em relação ao suicídio, os dados apontam que em 2012, que essa foi a causa de óbito para 804 mil pessoas em todo o mundo (cerca de 1,5% de todas as mortes). No entanto, esse é um tipo de morte subregistrado, uma vez que o registro é complicado e envolve diversas autoridades, além de ser considerado crime em muitos países. É importante destacar que as, taxas de suicídio são maiores na população com 70 anos ou mais, tanto para homens quanto

para mulheres e as principais formas utilizadas para provocar a própria morte são: arma de fogo e ingestão de pesticidas (WHO, 2014).

Quanto ao Brasil, nos últimos vinte anos, a taxa de suicídio cresceu 30% entre os indivíduos com idades entre 15 e 29 anos – esse crescimento é maior do que a média da população total – tornando-se a terceira principal causa de morte de pessoas em plena vida produtiva (BRASIL, 2008).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA E PATOFISIOLOGIA DA DEPRESSÃO

Os transtornos depressivos, conforme definido pelo DSM-V (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual fifth- edition*) estão tipicamente presentes em adolescentes e/ou início da idade adulta, podendo ser crônicos ou episódicos e são muitas vezes recorrentes. Podem ser acompanhados de comorbidades, como abuso de substâncias e transtornos nas condições de saúde física e mental, tornando esse tipo de transtorno uma das principais preocupações dos sistemas de saúde pública (FERRARI et al, 2013). A variação desse transtorno num período em 12 meses é em média de 23,1 a 33,8 semanas, de acordo com a *World Mental Health Survey* (WMHS). Além disso, a prevalência é variável em diferentes países, de 2,2% no Japão até 5,8% no Brasil (BROMET et al., 2011).

A depressão é um transtorno psiquiátrico relativamente comum, de curso crônico e recorrente frequentemente associado com incapacitação funcional e comprometimento da saúde física (BRASIL et al., 2011). Afeta cerca de 20% da população mundial, sendo mais frequente em mulheres (numa proporção de 5 mulheres para 2 homens) (BERTON e NESTLER, 2006). É importante destacar que os transtornos unipolares, como depressão maior e a distímia, se distinguem dos TEBs, pelo fato de não terem históricos de episódios de mania ou hipomania.

Formas graves de depressão afetam 2% a 5% da população dos EUA e indivíduos que sofrem de depressão severa apresentam altas taxas de comorbidades e mortalidade (NEMEROFF, 2007). Estimasse que o custo anual da depressão para os EUA está em torno de 70 bilhões de dólares entre despesas médicas, e perda da produtividade (DISNER et al., 2011). Ademais, em média 15% dos indivíduos com depressão maior cometem suicídio (RZEZNICZEK et al., 2016).

Os pacientes deprimidos apresentam limitação das suas atividades, e maior utilização de serviços de saúde. Entre 30% a 60% dos casos de depressão não são detectados por médicos clínicos em serviços de atenção primária a saúde e, assim, muitos pacientes com depressão não recebem tratamento adequado. Nos EUA, 51% dos indivíduos que tiveram episódios

depressivos em 2010 receberam tratamento, contudo a intervenção foi considerada adequada em apenas 21% dos casos. Acredita-se que 70% das morbidades e da mortalidade associadas à depressão poderiam ser prevenidas se houvesse tratamento adequado (DISNER et al., 2011).

Neste sentido, o diagnóstico adequado e rápido é fundamental para melhorar a eficácia do tratamento e na história natural dos transtornos psiquiátricos. Cabe enfatizar que o diagnóstico definitivo de um transtorno mental ou de comportamento só pode ser feito através de uma detalhada anamnese psiquiátrica, por profissional devidamente preparado para tal. O DSM-V estabelece critérios básicos para diagnóstico de episódios depressivos (Quadro 1). Esses sintomas devem estar presentes na maior parte do dia, em quase todos os dias das últimas duas semanas e devem representar uma mudança substancial em relação ao comportamento anterior do indivíduo. Além disso, esses devem causar aflição ou prejuízo nas áreas social, ocupacional ou outras áreas importantes de funcionamento, ainda, essas alterações no comportamento não podem ser atribuídas ao uso/abuso de substância, condições médicas ou a morte de um ente (DISNER et al., 2011).

Quadro 1- Critérios para diagnóstico de episódio depressivo segundo o DSM-V

Cinco (ou mais) dos seguintes sintomas por mais de 2 semanas
Humor deprimido
Perde de interesse ou capacidade de sentir prazer
Perda ou ganho significativo de peso
Insônia ou Hipersonia
Agitação ou retardo psicomotor
Fadiga ou falta de energia
Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inadequada
Capacidade diminuída de pensar ou concentrar-se, ou indecisão
Pensamentos recorrentes de morte e/ou ideação suicida

Fonte: DSM-V

Além do DSM o diagnóstico pode se basear na Classificação Internacional de Doenças (CID-10). No entanto, uma vez que estas classificações não possuem mecanismos etiológicos, neurobiológicos e farmacológicos da patogênese em níveis celulares e moleculares, e baseiam-se apenas em observações, as síndromes depressivas ainda não podem ser claramente codificadas e/ou compreendidas (CZARNY et al., 2017).

De acordo com Valasques Junior (2015) a depressão pode ser classificada em :

**-Reativa ou Secundária:** Consequência de doenças físicas, reações de luto ou de ação de fármacos (Reserpina, Clonidina, Metildopa, Clorpormazina, Acetazolamida, Atropina, Corticosteróides, Benzodiazepínicos, Barbitúricos etc). Corresponde a mais de 60% de todas as depressões.

**-Distímia:** Forma crônica e incapacitante, os sintomas se estendem por no mínimo 2 anos em adultos. A pessoa consegue relacionar-se socialmente, mas sem experimentar prazer, tem dificuldade em encontrar o sentido das coisas.

**-Melancólica ou recorrente:** Não tem relação causal com situações estressantes, patologias orgânicas ou psiquiátricas, caracterizando-se por episódios puramente depressivos em períodos variáveis da vida. Possivelmente decorre de uma pré-disposição genética do indivíduo, que apresenta uma ação ou utilização deficiente dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e/ou serotonina.

**-Associada ao Transtorno Bipolar:** Episódios depressivos alternados com fases de mania ou de humor normal. O paciente tem oscilações cíclicas de humor entre "altos" (mania) e "baixos" (depressão).

O tratamento da depressão deve ser compreendido de uma forma interdisciplinar, portanto, a terapia deve abranger psicoterapia, mudanças no estilo de vida e a terapia farmacológica. O tratamento farmacológico da depressão pode ser classificado de acordo com a estrutura química das drogas antidepressivas ou de acordo com a ação sobre os neurotransmissores (AGUIAR et al., 2011).

### **1.3.1 Neurobiologia e possíveis mecanismos fisiopatológicos da depressão**

A depressão é um transtorno multifacetado com diversas causas, e o conhecimento sobre os seus mecanismos patogênicos ainda é limitado. Os sistemas que tem recebido maior atenção nos estudos da neurobiologia da depressão incluem os circuitos neurais, a hipótese das monoaminas, a plasticidade neural, mecanismos neuroendócrinos, como a hipótese das citocinas, e a hipótese epigenética (JEON e KIM, 2016).

#### *1.3.1.1 Circuitos Neurais*

Várias regiões e circuitos do cérebro regulam nossas emoções, sistemas de recompensa e de execução de funções. Alterações disfuncionais nessas regiões límbicas que são altamente interligadas possivelmente implicam em sintomas depressivos (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

Dados compilados na revisão de literatura de Willians (2016), demonstram que estudos de imagens, de pacientes com depressão mostram redução no volume de substância cinzenta e densidade glial no córtex pré-frontal e no hipocampo - possíveis regiões mediadoras dos aspectos cognitivos da depressão, como sentimentos de inutilidade e culpa. Outro estudo combinando técnicas comportamentais, moleculares e eletrofisiológicas revelou que certos aspectos da depressão podem ser resultado de alterações na neuroplasticidade cerebral induzida por estresse emocional (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

O hipotálamo está associado à disfunção cognitiva na depressão, o hipocampo é envolvido no circuito fechado de realimentação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), e podendo resultar em transtornos neuroendócrinos. Danos nas funções do córtex pré-frontal podem causar depressão, perda de memória, e retardo psicomotor (PRICE e DEVETS, 2012).

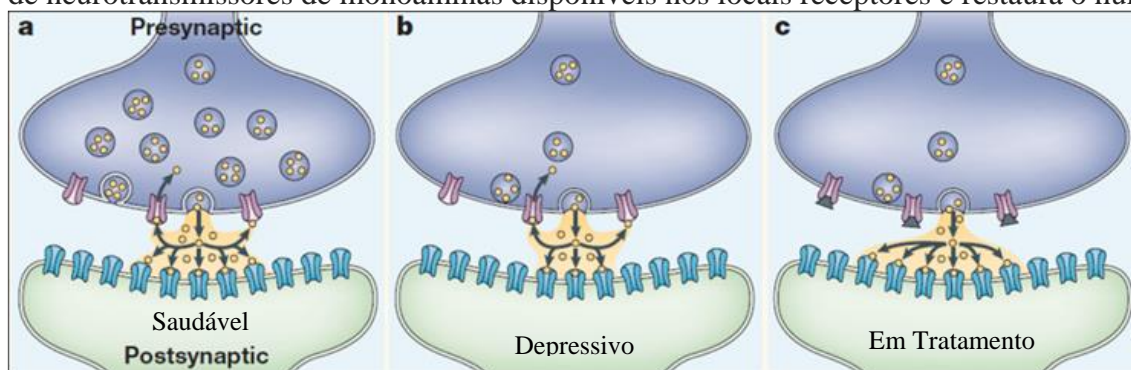
O sistema de dopamina mesolímbico está envolvido em mecanismos de motivação e recompensa e é neuralmente conectado a partir da área tegmental ventral ao núcleo accumbens. Esse sistema está especificamente relacionado com a anedonia e anergia da depressão. Em síntese, múltiplas regiões do cérebro estão provavelmente associadas com a fisiopatologia da depressão. A disfunção pode se desenvolver separadamente em várias regiões do cérebro ou em uma região específica ocasionando danos a outras regiões (MURRAY et al., 2011; JEON e KIM, 2016).

### *1.3.1.2 Hipótese das Monoaminas*

A hipótese monoaminérgica tem sido reconhecida como um conceito central na patogênese da depressão. Essa teoria postula que a depressão resulta de um desequilíbrio funcional ou deficiência de neurotransmissores ou receptores da série das aminas: dopamina, serotonina e norepinefrina (KISS, 2008). Esta hipótese é suportada pela ação de fármacos antidepressivos que bloqueiam a recaptção de serotonina e/ou norepinefrina ou inibem a sua degradação, aumentando a concentração das mesmas na fenda sináptica (Figura 1) (TALLON et al., 2016).



Figura 1: Disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica. A | No cérebro normal, os neurotransmissores de monoamina (amarelo) são liberados e se ligam aos receptores no neurônio pós-sináptico. A transmissão é encerrada pela reabsorção do transmissor. B | Na depressão, a diminuição da concentração de monoamina em locais sinápticos produz um transtorno de humor. C | O bloqueio dos sítios de reabsorção (cinza) aumenta a concentração de neurotransmissores de monoaminas disponíveis nos locais receptores e restaura o humor.



Adaptado de: Castrén, (2005).

Contudo, apesar do aumento nos níveis de monoaminas ocorrer quase que imediatamente após o início do tratamento, os efeitos terapêuticos dos antidepressivos se manifestam somente após 3 a 4 semanas de tratamento (WONG e LICINIO, 2001). Entretanto, a hipótese das monoaminas isoladamente não parece ser apropriada para explicar a depressão, embora os antidepressivos, baseados na hipótese das monoaminas sejam a primeira escolha para tratamento da depressão (ZOWKOWSKI, 2012; PRICE e DREVETES, 2012). Cabe ressaltar que um terço dos pacientes não responde ao tratamento com inibidores da recaptação de monoaminas (IWATA et al., 2013).

### 1.3.1.3 Plasticidade neural e neurogênese - Hipótese do BDNF

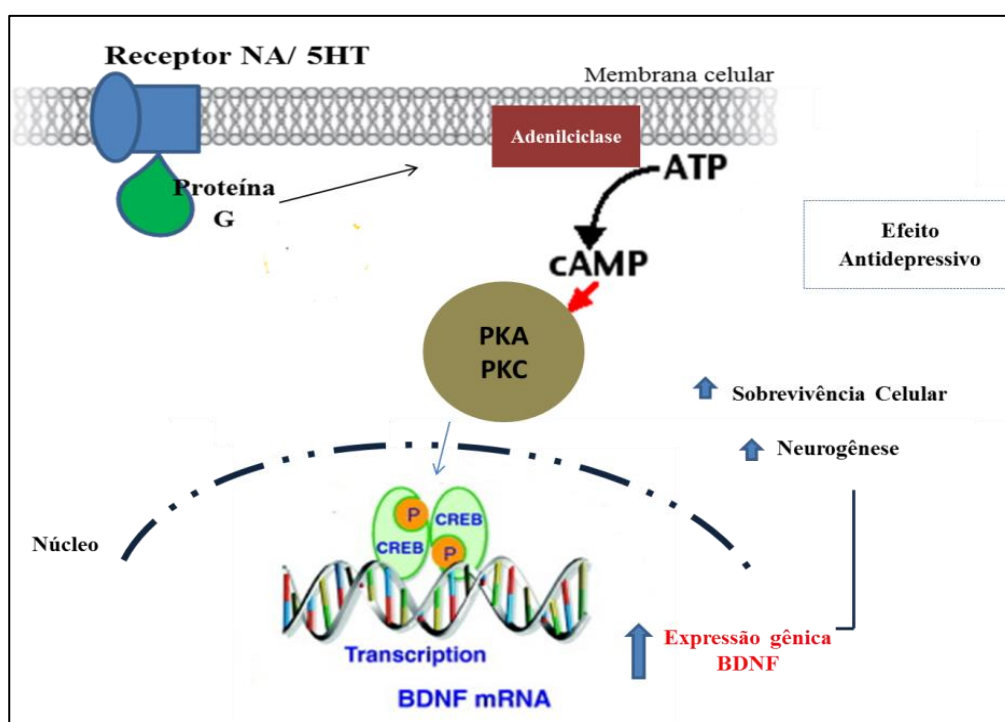
As alterações volumétricas observadas no hipocampo e em outras regiões prosencefálicas evidenciadas nos pacientes com depressão levaram à hipótese do envolvimento de fatores neurotróficos e diminuição da neurogênese na patogênese na depressão (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

Os estudos a cerca desta hipótese têm concentrado a atenção no papel do BDNF (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*), o qual é expresso em abundância nas estruturas límbicas em pacientes saudáveis, e significativamente reduzido em pacientes depressivos. O BDNF faz parte de cascatas que favorecem a neurogênese e dificultam a morte de neurônios (JEON e KIM, 2016).

Os seus níveis dependem da atividade de uma cascata intracelular (Figura 2): a ligação de um neurotransmissor (noradrenalina ou serotonina) a um receptor acoplado a uma proteína G

aumenta a atividade da adenilciclase e da fosfolípase C, desta forma aumentando a concentração intracitosólica de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico/ AMP cíclico ) e de diacilglicerol estes segundos mensageiros ligam-se às proteína cinases A e C, respectivamente, facilitando a sua atividade de fosforilação de uma proteína ativadora CREB (do inglês, *cAMP response element* (CRE) *binding*), que por sua vez facilita a transcrição de BDNF, o qual favorece a neurogênese e a sobrevivência celular e causa efeitos antidepressivos (SCHMIDT e DUMAN 2010; LAGE, 2010; JEON e KIM, 2016).

Figura 2: Rota sinalizadora do possível efeito antidepressivo do BDNF



Fonte: A autora desta Tese

A fosforilação do CREB é o ponto de convergência entre as cascatas intracelulares da noradrenalina e dopamina que culmina com a ativação de vários genes, dentre eles o gene que codifica a proteína BDNF (SCHMIDT e DUMAN 2010; LAGE, 2010; JEON e KIM, 2016).

O BDNF é uma das possíveis explicações para a demora do aparecimento do efeito antidepressivo dos fármacos que agem via monoamina. Uma vez, que pela teoria das monoaminas os antidepressivos funcionam via aumento dos níveis de neurotransmissores, entretanto antidepressivos tradicionais como a Fluoxetina aumentam níveis de serotonina de 6 a 8 horas após a ingestão, assim apesar da modulação serotoninérgica imediata, os efeitos antidepressivos demoram semanas. A possível explicação para isto seria que o tratamento de longo prazo com estes fármacos favorece a neurogênese no hipocampo juntamente com o aumento dos níveis de BDNF. Assim, é postulado que os antidepressivos seriam capazes de

aumentar os níveis de BDNF, o que acarretaria em aumento na neurogênese e plasticidade das sinapses no hipocampo, produzindo efeitos antidepressivos (NUMAKAWA et al., 2010; MIZUI et al., 2015).

#### 1.3.1.4 Hipótese das Citocinas

Hoje, pode se dizer que uma extensa literatura científica apoia o papel da inflamação na depressão. Segundo Mille e Raison (2016) pacientes depressivos apresentam características fisiológicas inflamatórias similares a aqueles com doenças de cunho inflamatório, incluindo o aumento dos níveis das citocinas pro-inflamatórias, com extensa ativação da rota M1 (macrófagos da rota inflamatória clássica). Essa hipótese pode ser sustentada por evidências como as obtidas, no estudo *post-mortem* realizado por Mille e colaboradores (2009). Este estudo observou, elevada expressão de genes relacionados a inflamação IL-1 $\beta$ , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e os receptores do tipo Toll: TLR3, TLR 4 em indivíduos depressivos que se suicidaram.

Tyring e colaboradores (2006) demonstraram que o bloqueio da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), reduz os sintomas depressivos em pacientes. Raison e colaboradores (2013) demonstraram que 45% dos pacientes que não apresentavam resposta terapêutica a antidepressivos convencionais exibiram proteína C-reativa (PCR)  $> 3\text{mg.L}^{-1}$ , indicativo de processo inflamatório agudo, demonstrando forte correlação entre pacientes não responsivos a antidepressivos e níveis elevados da PCR.

É válido ressaltar que Mille e Raison (2016), em sua revisão comentaram que a análises das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e da PCR no sangue periférico são consideradas biomarcadores confiáveis para identificar inflamação em pacientes com depressão.

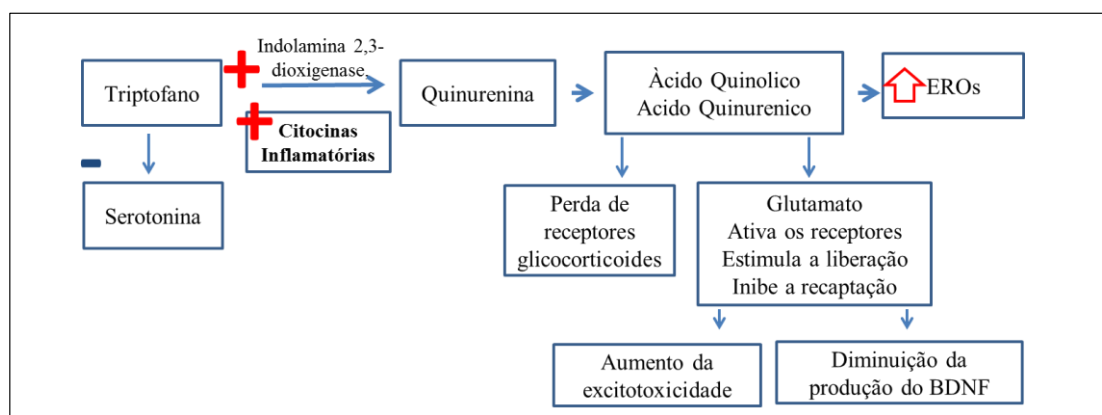
Zhu e colaboradores (2010), demonstraram que estímulos inflamatórios periféricos em ratos foram capazes de aumentar a atividade dos transportadores de serotonina no cérebro, levando à diminuição da disponibilidade sináptica desse neurotransmissor e consequente comportamento depressivo nos animais.

Além disso, evidências sugerem que as citocinas inflamatórias podem agir estimulando a enzima indolamina 2,3-dioxigenase, que é responsável pela degradação de triptofano (TRP) pela via das quinureninas e, como consequência dessa degradação do TRP, a síntese de serotonina fica comprometida, pois o TRP é precursor deste neurotransmissor. Aliado a isso, os metabólitos da via das quinureninas estão envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos. Algumas quinureninas, como o ácido quinolínico, induz a produção de metabólitos

neurotóxicos como o quinolinato presente em altos níveis em indivíduos deprimidos (BRYLEVA e BRUNDIN, 2017). O ácido quinolínico é também um agonista de receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) que prejudica o *feedback* negativo de glicocorticóides e causa atrofia do hipocampo e perda de receptores glicocorticoides (BRYLEVA e BRUNDIN, 2017).

Sabe-se, ainda que o ácido quinolínico é capaz de ativar os receptores de glutamato ao mesmo tempo em que estimula a liberação deste neurotransmissor, e inibe a sua recaptção pelos astrócitos, convergindo em efeitos diretos das citocinas pró-inflamatórias sobre o metabolismo do glutamato. Esse efeito leva a diminuição da expressão do glutamato nos astrócitos e estimula as bombas de recaptção deste neurotransmissor. Por sua vez, a ligação do glutamato aos receptores de NMDA extra sinápticos leva ao aumento da excitotoxicidade e a diminuição da produção do BDNF, reduzindo assim o efeito antidepressivo no hipocampo, que é realizado por essa molécula (Figura 3) (MILLE e RAISON, 2016).

Figura 3: Hipótese das Citocinas: representação da via das quinureninas



Fonte: A autora desta Tese

É bem conhecido que o eixo HPA é um sistema chave na regulação da resposta ao estresse biológico. As citocinas pró-inflamatórias tem a capacidade de causar hiperatividade deste sistema e/ou reduzir os mecanismos de retroalimentação negativa da produção de glicocorticoides, como é o caso do cortisol. Em indivíduos saudáveis, o cortisol irá inibir a liberação de mais agentes pró-inflamatórios, já que tal hormônio possui efeito imunossupressor. Entretanto, em pacientes depressivos o cortisol perde esta capacidade imunossupressora, possivelmente porque a ativação de citocinas pró-inflamatórias é capaz de inibir a expressão de genes dos receptores desse glicocorticoide (DELL-OSSO et al., 2011).

### 1.3.1.5 Hipótese Epigenética

A hipótese de envolvimento da epigenética na depressão vem sendo estudada, atualmente as pesquisas estão focadas em mecanismos epigenéticos, que se referem a alterações, resultantes da interação gene-ambiente. Estas alterações induzem modificações pós-transcricionais no DNA (ácido desoxirribonucleico), desligando ou ligando genes que estavam ativos ou inativos e que podem mediar alterações em longo prazo na expressão do gene, independente de mudanças na sequência de DNA. Genes desligados por alterações epigenéticas são chamados de “genes silenciados” (BAGOT et al., 2014).

Vem surgindo diversos estudos que apoiam essa hipótese, Como por exemplo, uma correlação foi encontrada entre o aumento da metilação, que induz um silenciamento gênico, na região promotora do gene BDNF. Este silenciamento leva a uma diminuição da síntese do BDNF nos neurônios. O mesmo trabalho também relatou que, foram encontradas alterações epigenéticas na estrutura da cromatina do gene BDNF em modelo de depressão em ratos (TSANKOVA et al., 2006).

Ademais, um aumento do nível de metilação do DNA no gene BDNF foi relatado estar associado á ocorrência de depressão na população em geral. Portanto, esses estudos indicaram que mudanças epigenéticas do BDNF podem desempenhar um papel importante na fisiopatologia da depressão (CHEN et al., 2017).

Evidências têm sugerido ainda, que a sensibilidade ao estresse pode ser transmitida através das gerações, tanto em roedores quanto em humanos (TSANKOVA et al., 2007). Schneider e colaboradores (2015), consideram que o estresse relacionado a situações vividas pode conduzir a alterações epigenéticas persistentes que podem influenciar o metabolismo, comportamento, cognição, humor, e funções neuroendócrinas. Ainda de acordo com os mesmos autores, mudanças no padrão de metilação de genes como AMD1, ARG2, BDNF, GABRA1, NTRK2, QKI, SKA2 e SSAT, estão também associadas a comportamento suicida.

Em síntese, por ser a depressão um transtorno psiquiátrico complexo, não existe uma única hipótese geral que explique o seu desenvolvimento. As múltiplas hipóteses levantadas parecem atuar conjuntamente, talvez alguma com maior ou menor impacto na fisiopatologia da depressão. Entretanto, estudos complementares precisam ser conduzidos para uma melhor compreensão dos mecanismos associados ao desenvolvimento da depressão.

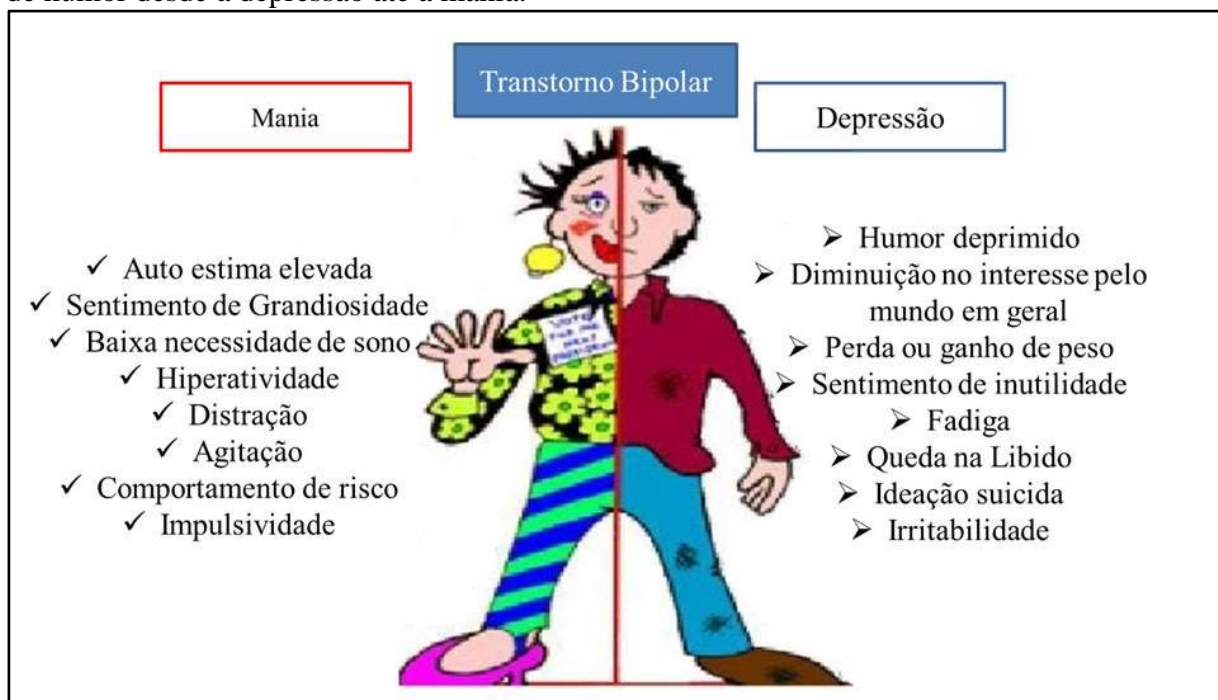
#### 1.4 EPIDEMIOLOGIA E PATOFISIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DO ESPECTRO BIPOLAR

Os TEBs são um grupo de doenças caracterizadas por mudanças extremas do humor, com o início dos sintomas observados entre os 15 e 30 anos. Correspondem a doenças graves e crônicas, com raros relatos de remissão sendo caracterizadas pelo comprometimento do desenvolvimento social e neuropsicológico (GOODWIN et al., 2008). Devido ao aparecimento precoce, os TEBs estão entre as seis principais causas de incapacidade no mundo, afetando cerca de 60 milhões de pessoas (FERRARI et al., 2011).

Os TEBs geralmente consistem na ocorrência, de ambos os episódios maníacos e depressivos que são separados por períodos de humor normal. Episódios maníacos envolvem humor elevado ou irritável, excesso de atividade, autoestima inflada e uma diminuição da necessidade de sono (WHO, 2015). Assim, o TEB causa mudanças incomuns no humor, energia, níveis de atividade, bem como a capacidade de realizar tarefas do dia-a-dia (WHO, 2015).

Essas variações de humor intercalam períodos eufóricos, conhecidos como episódios maníacos, e períodos de tristeza, conhecidos como episódios depressivos (Figura 4). Apesar de complexo, o diagnóstico para os TEBs está bem estabelecido no DSM-V, sendo caracterizado pela presença de humor persistente e anormalmente elevado, expansivo ou irritável que dura, pelo menos uma semana.

Figura 4: Representação de um indivíduo bipolar. A figura demonstra uma gama de mudanças de humor desde a depressão até a mania.



Fonte: Adaptada de Last, (2009).

### 1.4.1 Patofisiologia dos TEBs

A patofisiologia dos TEBs envolve os sistemas de neurotransmissores das aminas biogênicas. A serotonina modula diferentes atividades neuronais, desse modo regulando diversas funções fisiológicas e comportamentais, como controle de impulsos, agressividade e tendências suicidas. Assim, a diminuição na liberação e da atividade da serotonina podem estar associadas a comportamentos de ideação e tentativa de suicídio, agressividade e transtornos do sono, bastante frequentes nos TEBs (ACKENHEIL, 2001). É sabido que no sistema nervoso central, muitos receptores de neurotransmissores são modulados pela proteína G, como é o caso da noradrenalina, dopamina e da serotonina.

Em relação, a associação entre depressão e serotonina, é importante destacar que essa molécula é um dos principais neurotransmissores encontrados no núcleo quiasmático hipotalâmico, sendo considerada o regulador central de todos os ritmos circadianos endógenos.

Como neurotransmissor excitatório a serotonina, regula o sono, o apetite, o humor, emoções e processos do controle comportamental. Nos órgãos periféricos, onde a maioria da serotonina do organismo se encontra (cerca de 95%), regula processos como a regeneração celular, motilidade intestinal, imunomodulação, tônus vascular, entre outros (HERR et al., 2017).

A serotonina, tem influência direta na regulação do eixo HPA. A atividade deste eixo é comandada pela secreção do hormônio liberador de corticotropina (HLC) e vasopressina pelo hipotálamo, os quais, por sua vez, ativam a secreção do hormônio adrenocorticotrópico pela pituitária, que finalmente estimula a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal. A serotonina é capaz de estimular a liberação do HLC. O que pode resultar em hipereatividade patológica do eixo HPA (HERR et al., 2017).

Em 1996 um estudo post-mortem com cérebros de pacientes portadores de TEBs constatou níveis significativamente menores do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que é o principal metabólito da serotonina no córtex frontal e parietal, quando comparado com indivíduos saudáveis. Essa evidência, corrobora a hipótese de diminuição na atividade serotoninérgica central como um dos fatores causais dos TEBs (YOUNG et al., 1996).

Já em 2016, estudo em pacientes portadores de TEBs observou diminuição dos níveis do receptor serotoninérgico 5-HIAA, no fluido cérebro-espinhal de pacientes maníacos e deprimidos, em comparação a sujeitos saudáveis. Esses resultados sugeriram que, tanto a mania quanto a depressão estão realmente associadas a uma redução na função serotoninérgica central (CHOU et al., 2016).

Estudos também mostraram que nos TEBs ocorre elevação da atividade da proteína G (WARSH et al., 2000, GOULD e MANJI 2002; FREY et al., 2004). Investigações complementares apontaram a ocorrência de predisposição genética aos TEBs associada principalmente a genes do ciclo circadiano, via alteração na síntese dos hormônios melatonina e cortisol. As anormalidades evidentes incluem desregulações hormonais. Essas anomalias são vistas não só durante as crises agudas, mas também nos períodos eutímicos (humor normal/neutro). A maioria desses indicadores é encontrada também em parentes saudáveis de pacientes bipolares, significando assim uma forte predisposição familiar. Desse modo, interferências na regulação do relógio circadiano estariam envolvidas na vulnerabilidade genética para o transtorno bipolar, lembrando aqui, que a serotonina é importante na regulação do relógio circadiano (MUNNER, 2016).

## 1.5 O PAPEL DA ALTERAÇÃO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIA NOS TRANSTORNOS PSQUIÁTRICOS

### 1.5.1 Inflamação

A inflamação é uma reação de defesa do organismo iniciada após uma infecção ou injúria. As respostas inflamatórias locais e/ou sistêmicas objetivam eliminar o estímulo que desencadeou a rota, promovendo a reparação do tecido, e se for o caso, estabelecendo a memória imune (FULLERTON e GILROY, 2016). Os macrófagos desempenham papel fundamental na regulação de processos inflamatórios agudos e crônicos através da secreção de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (FULLERTON e GILROY, 2016). Essas células apresentadoras de antígeno, potencializam a ativação de Linfócito T e B pela expressão de moléculas co-estimuladoras e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral alfa). Macrófagos sintetizam ainda EROs ( $O_2^-$ , OH,  $H_2O_2$ ) e intermediários reativos do nitrogênio, cujo principal representante é o ON. (CRUVINEL et al., 2010). Portanto, processos inflamatórios sempre envolvem a modulação do metabolismo oxidativo celular.

O processo inflamatório tem início quando receptores de reconhecimento de hospedeiros PRRs (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) detectam segmentos moleculares conservados, os PAMPs (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Pattern*). Os PAMPs também agem como moléculas derivadas de hospedeiros que sinalizam a presença de lesões



teciduais, DAMPs (do inglês, *Damage-Associated Molecular Patterns*) (LACKEY e OLEFSKY, 2015).

Cinco classes de PRRs estão descritas: receptores do tipo Toll (TLRs), receptores tipo ligação de nucleotídeo (NLRs), receptores “tipo ausentes em Melanoma 2” (ALR), receptores de leptina tipo C, além de DAMPs localizados no meio extracelular ou dentro de vacúolos. Alguns PRRs desencadeiam a ação pró-inflamatória através das rotas envolvendo o fator nuclear kappa beta (NF $\kappa$ B) ou fatores regulatórios do interferon gama (INF $\gamma$ ). Outros PRRs promovem a defesa do organismo via ativação de inflamossomas (LACKEY e OLEFSKY, 2015).

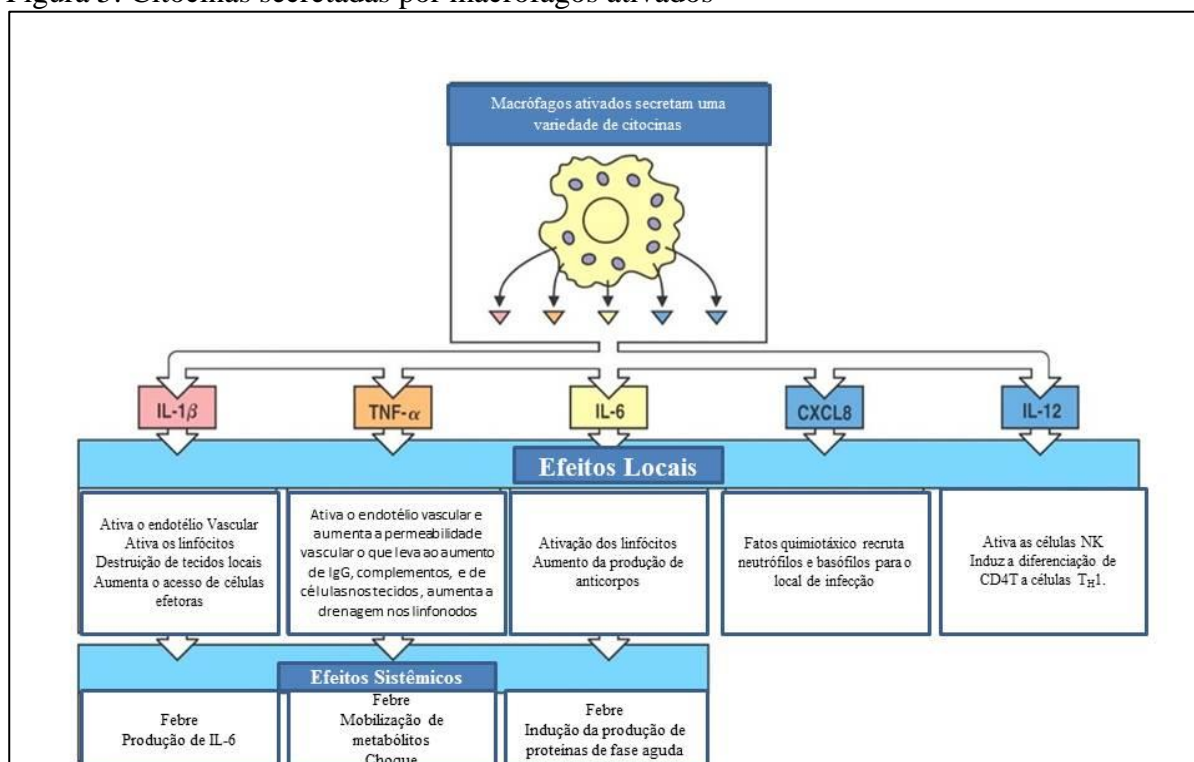
Fundamentais no processo inflamatório, os inflamossomas são complexos macromoleculares que se unem ao citoplasma e ativam a proteína caspase 1. Tipicamente esses complexos consistem de um receptor NLR, um receptor ALR e um adaptador proteico a ASC (do inglês, *Apoptosis-associated speck-like protein*). Esse conjunto é capaz de reconhecer e se ligar a caspase 1, que por sua vez promove a ativação da resposta imune inata (CRUVINEL et al., 2010; FULLERTON e GILROY, 2016).

A ativação da caspase 1 tem como consequência, além de desencadear a piroptose (uma forma de morte celular programada), a clivagem proteolítica da pró-interleucina 1 $\beta$  presente no citoplasma, formando a IL-1  $\beta$  madura (FULLERTON e GILROY, 2016). A IL-1 $\beta$  induz o processo inflamatório pela indução da síntese pelos macrófagos de outras citocinas como IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$ , a infiltração de células inflamatórias no local através da indução da expressão de receptores (moléculas de adesão) nas células endoteliais vasculares do tipo que permitem a ligação dos monócitos e posterior migração destas células para o local da inflamação (Figura 5) (ROITT et al., 2014).

Por ser extensivamente secretada e permanecer em níveis significativos como pró-IL-1 $\beta$  no citoplasma, esta molécula é considerada a principal citocina pró-inflamatória produzida por células como os macrófagos. Níveis baixos de IL-1 $\beta$  induzem resposta inflamatória limitada. Contudo níveis elevados de IL-1 $\beta$  induzem resposta inflamatória generalizada, dano tecidual e supressão imune (VORONOV et al., 2014; LACKEY e OLEFSKY, 2015).

A IL-1 $\beta$  ativa rotas como NF- $\kappa$ B e MAPK (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinases*) capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias adicionais como a IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$  (VORONOV et al., 2014).

Figura 5: Citocinas secretadas por macrófagos ativados



Fonte: Adaptada de Roitt et al., (2014).

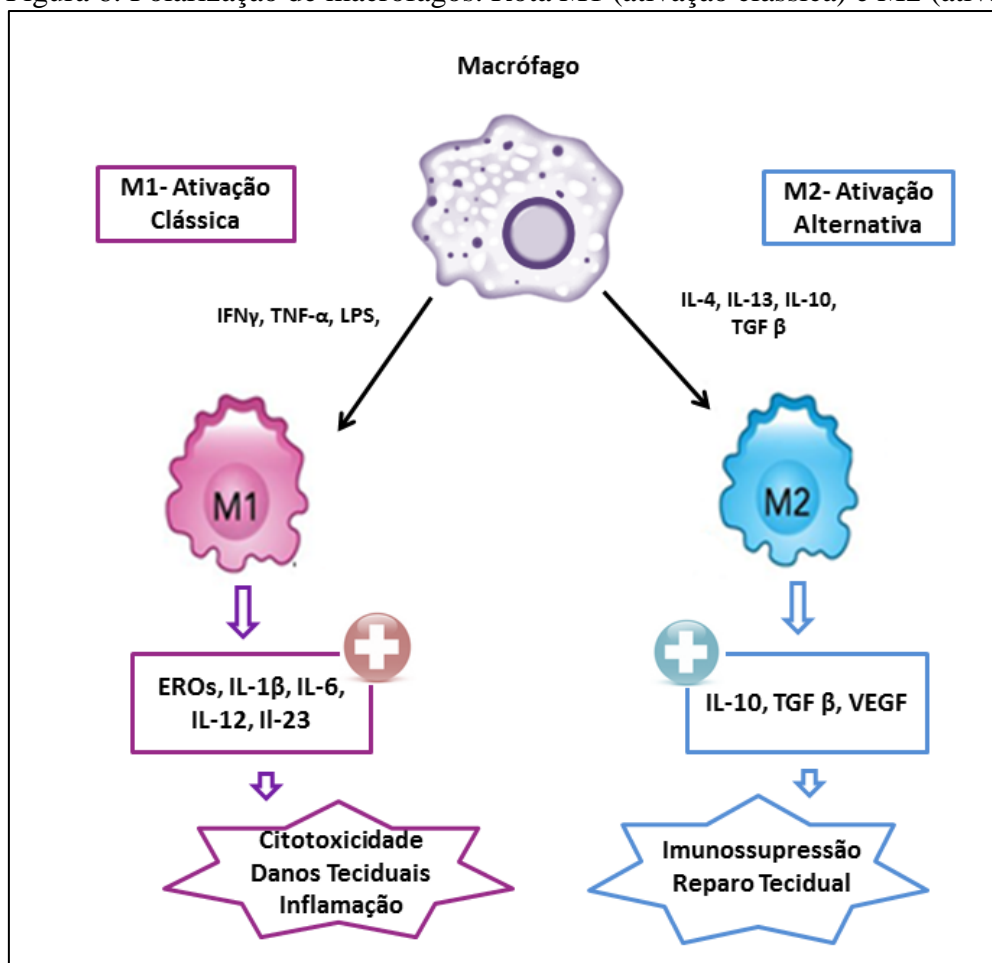
O fenótipo de um macrófago está intimamente relacionado com o microambiente em que residem, pois os macrófagos são capazes de alternar fenótipos constantemente tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HE e CARTER, 2015). Em inflamações agudas ocorre a ativação da rota clássica de inflamação, denominada M1, e em seguida a ativação de macrófagos da rota alternativa, denominada M2. Os macrófagos ativados pelos agonistas de INF- $\gamma$  e / ou TLR pertencem a rota M1 e produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e EROs, que são cruciais para suas atividades microbicidas. Os macrófagos M2 têm um importante papel na “limpeza do processo inflamatório”, na remodelação tecidual e angiogênese (MEHTA et al., 2017).

Assim, os macrófagos M1 representam a via clássica e exercem atividade antiproliferativa e citotóxica, resultante particularmente da capacidade de secretar ON, EROs e as citocinas pró-inflamatórias já citadas (BRUNE et al., 2013). Já os macrófagos M2, que representam a via alternativa com capacidade de inibir as funções inflamatórias e citotóxicas de M1, induzem um aumento de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- $\beta$  (do inglês, *Transforming growth factor-beta*). Os macrófagos M2, possuem ação imunossupressora diminuindo a proliferação dos linfócitos T (BRUNE et al., 2013).

Em condições fisiológicas, em que não está ocorrendo uma inflamação, as populações de macrófagos M1 e M2 permanecem como uma combinação estável. Entretanto, frente a uma

situação que exige uma resposta inflamatória, ocorre a polarização funcional e os macrófagos ativados do tipo M1 apresentam níveis elevados de IL-1 $\beta$  e baixos de IL-10. Após o controle da inflamação, a ativação dos macrófagos M2 induz a produção de IL-10, que por sua vez inibe os macrófagos M1, reduzindo assim os níveis das citocinas pró - inflamatórias (Figura 6) (BRUNE et al., 2013).

Figura 6: Polarização de macrófagos. Rota M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa).

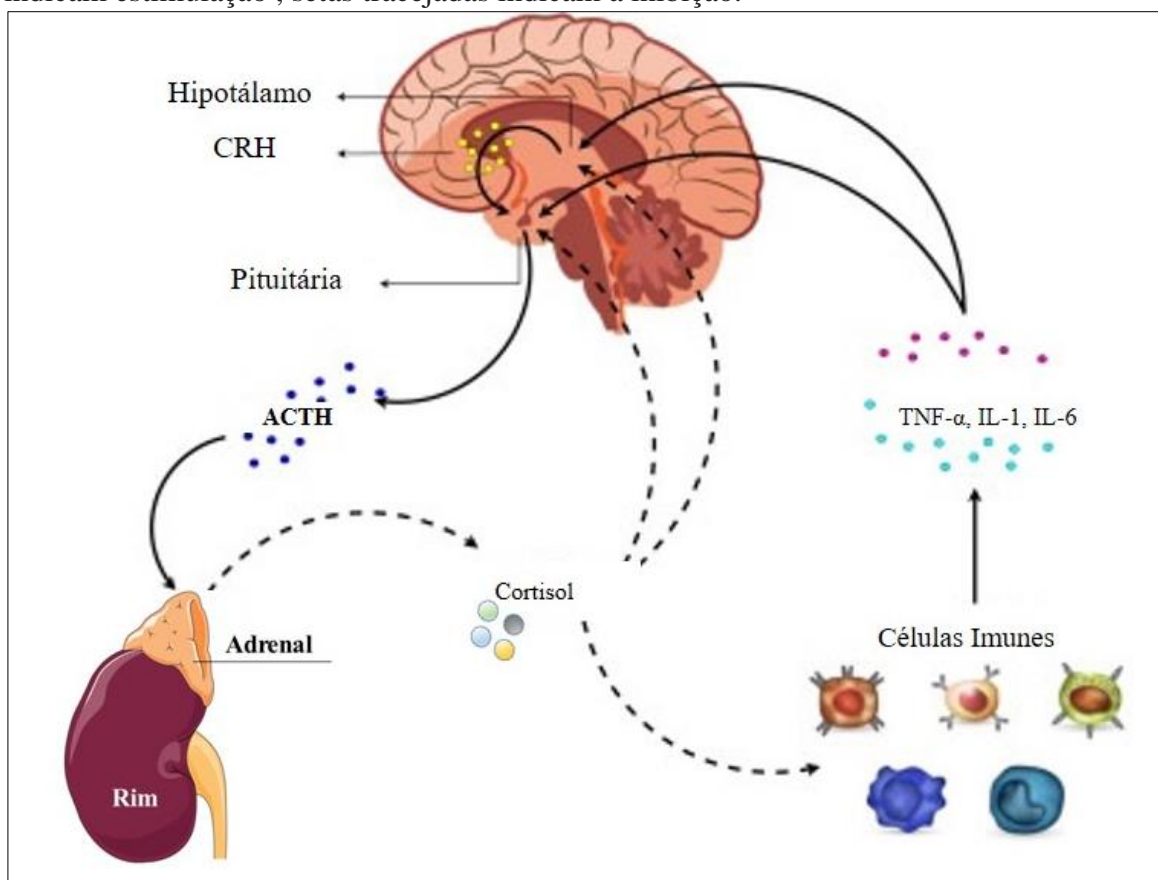


Fonte: A autora desta Tese

A inflamação sistêmica está diretamente relacionada com a ativação de macrófagos e com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-2 no sistema nervoso central. Essas citocinas pró-inflamatórias induzem a ativação inflamatória de linfócitos T, especificamente do subtipo Th 1 (do inglês: *T helper cell*), que podem desencadear a ativação da micróglia e, conseqüente, uma resposta inflamatória em todo o sistema nervoso central (CHERRY et al., 2014). Aqui é importante salientar que a ativação do eixo HPA é crítica na modulação da inflamação aguda, que sempre é desencadeada quando existe a necessidade de combater uma infecção por microrganismos ou mesmo recuperar uma lesão física que o corpo

sofreu. Para tanto, a inflamação aguda envolve aumento direto da produção de cortisol (Figura 7) sendo essa uma resposta adaptativa importante para o organismo (WRIGHT et al., 2005).

Figura 7: Eixo HPA e processo inflamatório. Durante o processo inflamatório são produzidas citocinas pró-inflamatórias pelas células imunes, as citocinas atuam em todos os três níveis do eixo HPA (Hipotálamo, pituitária e adrenal) e através da ativação do eixo HPA, estimulam a liberação de glicocorticóides, por sua vez, suprimem a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias adicionais. Os glicocorticóides como o cortisol regulam a sua própria produção através de feedback negativo nos níveis superiores do eixo HPA, incluindo o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e de adrenocorticotropina (ACTH) na hipófise. Setas sólidas indicam estimulação, setas tracejadas indicam a inibição.



Adaptada de: Fries et al., (2014).

A inflamação é um processo chave para a sobrevivência do organismo, mas quando se torna crônica pode levar ao desenvolvimento de diversas DCNTs, incluindo desordens psiquiátricas. Evidências epidemiológicas têm descrito associação entre inflamação crônica com TEBs e depressão maior (CHANG et al., 2017; SAYANA et al., 2017; MUNNEER, 2017). Além das alterações nos níveis ou receptores dos neurotransmissores, um conjunto de evidências emergiu nos últimos dez anos sugerindo alterações em outras células do sistema nervoso central, que não apenas os neurônios (CHIAPPONI et al., 2016). No caso, as demais células do SNC são conhecidas como células da glia, que possuem um importante papel no suporte e funcionamento

do sistema. As células da glia encontram-se em uma proporção de 10 células para cada neurônio. Entretanto, como o tamanho dessas células é menor do que a dos neurônios, elas acabam ocupando apenas a metade do volume do tecido. As principais células da glia são os oligodendrócitos, as células de Schwann, os astrócitos, as células ependimárias e a micróglia nervosa (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

Estudos como o de Elsayed e Magistretti (2015) têm sugerido que alterações nessas células são de grande relevância na patofisiologia das doenças mentais. Assim, dentro das alterações nas doenças psiquiátricas associadas as funções das células da glia, a inflamação tem papel destacado. A ativação inflamatória das células microgliciais é uma resposta crítica a praticamente todos os insultos do SNC, e a ativação da microglia, ocorre em quase todas as doenças neurodegenerativas, e essa ativação poderia eventualmente levar a lesões neuronais devido à produção persistente de mediadores inflamatórios tóxicos, tais como as citocinas e as EROs (HORSSSEN et al., 2017). Ainda os astrócitos, neurônios e o sistema imune periférico têm sido implicados na inflamação crônica, que está associada ao estresse oxidativo também presente em transtornos psiquiátricos como a SCZ (LEZA et al., 2015).

Assim, aliada as desordens hormonais e de neurotransmissores, têm sido descrita a ocorrência de alterações no sistema imunológico em pacientes portadores de TEBs, similar ao que ocorre em pacientes depressivos. Nessa perspectiva, a ocorrência de aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, PCR e marcadores de ativação de células-T têm sido associados com a progressão do transtorno bipolar (REGE e HODGKINSON, 2013; DARGÉL et al, 2015).

Em um recente estudo realizado por Hoseth e colaboradores (2017), os pesquisadores mediram os níveis plasmáticos de TNF, e dos receptores solúveis de TNF, em 624 pacientes esquizofrênicos ou com TEBs, em comparação com 824 controles. Os resultados mostraram significativo aumento nos marcadores inflamatórios citados, no grupo portador de SCZ ou TEBs. Uma vez que a inflamação envolve a modulação de diversas moléculas relacionadas também foi observado aumento nos níveis das citocinas pró inflamatórias IL-1, TNF- $\alpha$  e da PCR em pacientes bipolares (TSAI et al., 2014).

A influência do sistema imune na patofisiologia de doenças que envolvem estados depressivos provavelmente passa pelo fato de que linfócitos são capazes de alterar a rota do triptofano, que é o aminoácido precursor da síntese da serotonina, deslocando-o para a via das quinureninas. Essa alteração resulta na produção de compostos tóxicos ao SNC, além de diminuir a produção de serotonina. Por esse motivo, acredita-se que tais eventos podem estar relacionados com as variações de humor observadas nos TEBs (DANTZER et al., 2008).

O estudo de Miller et al. (2013), propôs que as citocinas pró-inflamatórias, quando secretadas de forma crônica alterariam a seletividade da membrana que forma a barreira hematoencefálica. Assim, estas citocinas teriam a capacidade de atravessar esta barreira atingindo o líquido cefalorraquidiano e propagando a informação inflamatória a diferentes regiões do sistema nervoso central, incluindo o eixo HPA.

No entanto, em casos de inflamação crônica, a contínua produção de citocinas pró-inflamatórias provoca redução na expressão e sensibilidade de receptores glicocorticoides. Em consequência, a redução na sensibilidade destes receptores inibe a resposta anti-inflamatória que seria desencadeada pelo cortisol. A insensibilidade destes receptores está relacionada ao desenvolvimento e progressão do transtorno bipolar (FRIES et al., 2014). Em geral os mecanismos relacionados à inflamação e o transtorno bipolar são similares a aqueles que foram descritos no item 1.3.1.4 - Hipótese das citocinas.

### **1.5.2 Função mitocondrial, metabolismo oxidativo e inflamação**

Um questionamento que pode ser postulado quando se observa associação entre inflamação crônica, depressão e TEBs é sobre qual fator causal endógeno poderia potencialmente induzir e manter este estado inflamatório anômalo. Estudos prévios, têm sugerido que, durante a fase de mania a atividade mitocondrial pode estar aumentada, com alta geração de ATP em virtude da grande demanda de neurotransmissão. Todavia, durante a fase de depressão, tais sujeitos podem apresentar um “desligamento” da mitocôndria, o que por sua vez acaba por conduzir a uma diminuição na produção energética e metabolismo mitocondrial (BROWN et al., 2014; MACHADO et al., 2016)

Com base nesses achados, e outros resultados obtidos a partir de investigações experimentais, cada vez mais, vem ganhando força a teoria de que doenças neuropsiquiátricas possuem relação direta com a ocorrência de disfunção mitocondrial, envolvendo não somente a produção de adenosina trifosfato (ATP), mas também a dinâmica mitocondrial, o metabolismo do cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e a expressão de genes mitocondriais e nucleares vinculados à arquitetura mitocondrial. Esta teoria é apoiada por evidências que descreveram que, portadores de TEBs apresentam alterações oxidativas relacionadas a disfunção da atividade mitocondrial, que ao invés de produzir ATP, aumenta a produção de moléculas como o ânion Superóxido levando, conseqüentemente a um estado de estresse oxidativo, que causa danos proteicos, lipídicos e ao DNA e compromete a homeostase celular. Entretanto parece que, a disfunção mitocondrial

encontrada em indivíduos com transtorno bipolar parece ser distinta da encontrada em portadores de SCZ (MACHADO et al., 2016).

De fato o TEB tem sido associado a uma significativa redução na expressão de genes que codificam proteínas que formam subunidades do complexo I mitocondrial, principalmente as proteínas NDUFS7 e NDUFS8. Desse modo, pacientes com este transtorno psiquiátrico apresentam desbalanço redox, principalmente via disfunção do complexo I, conduzindo a uma maior suscetibilidade e geração basal de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SCOLA et al., 2013) e seus consequentes danos celulares oxidativos (BROWN et al., 2014).

Provavelmente, o aumento do estresse oxidativo em consequência da eficiência reduzida da mitocôndria em produzir ATP, contribui para a indução e manutenção de estados inflamatórios crônicos. Dada a potencial relevância do estresse oxidativo na fisiopatologia da depressão e dos TEBs é importante destacar as bases conceituais relacionadas ao metabolismo oxidativo celular.

O metabolismo oxidativo é um processo bioquímico no qual o oxigênio é utilizado para a produção de energia, principalmente a partir de hidratos de carbono. Esse processo também pode ser denominado metabolismo aeróbico, respiração aeróbia e respiração celular (PERL, 2013). Durante o metabolismo oxidativo ocorre a geração de EROs, em um processo contínuo e fisiológico, com funções biológicas relevantes como: participação na fertilização do óvulo e mecanismos de defesa do organismo. Durante os processos metabólicos, as EROs atuam como mediadoras para a transferência de elétrons em reações bioquímicas, e a produção de EROs em proporções adequadas, possibilita a geração ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons, (que ocorre na mitocôndria), porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010). Vale ressaltar uma vez mais, que níveis basais de espécies reativas são importantes para a manutenção da homeostase do organismo, já que EROs como o  $H_2O_2$  e o óxido nítrico (ON) atuam como sinalizadores celulares de proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular (MACHADO, 2014).

Dentro do metabolismo oxidativo, um evento bastante estudado é o estresse oxidativo, definido como um desequilíbrio entre a (maior) produção e a neutralização de EROs. Nessa perspectiva, o desequilíbrio pró-produção de EROs pode ocorrer via exposição a fatores que favorecem a instauração do estresse oxidativo, dos quais se destacam: processos inflamatórios, exposição ao estresse, infecções bacterianas e virais, alimentação baseada em gorduras e carboidratos, sedentarismo e em função da queda nas defesas antioxidantes (PERL, 2013).

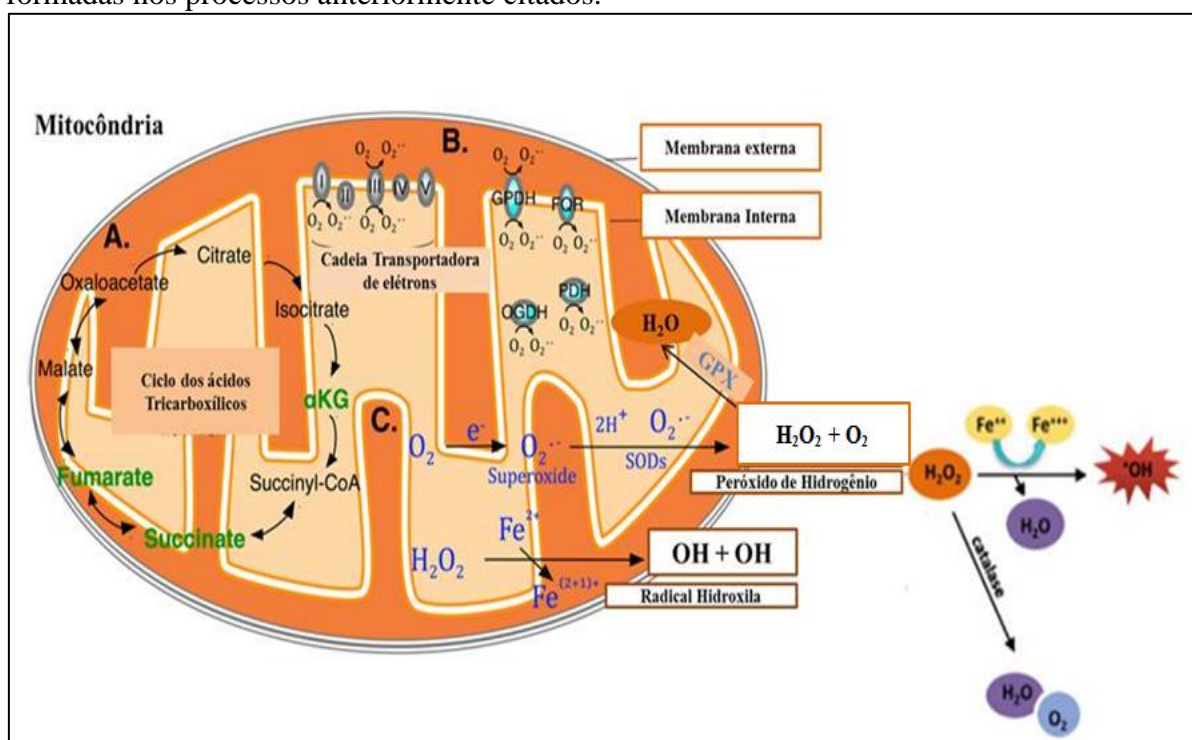
As EROs são produzidas principalmente na mitocôndria, onde ocorre o metabolismo aeróbico. No interior dessas organelas, o oxigênio passa pela cadeia transportadora de elétrons gerando ATP, ou seja, energia metabólica. Entretanto, a redução do oxigênio é incompleta e

conduz à geração de diferentes EROs, tais como o radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), considerado o principal contribuinte para danos oxidativos (VITALE et al., 2013). O  $H_2O_2$  é capaz de originar outras EROs, principalmente o radical hidroxila ( $OH^-$ ), que por ter uma meia vida bastante curta, e dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Ainda, sobre o  $OH^-$  este apresenta grande afinidade com o DNA, causando danos a essa molécula (PERL, 2013, BARBISAN, 2014).

Sendo as EROs moléculas de grande reatividade, capazes de causar danos em células e tecidos e ocasionar doenças, o organismo ao longo da evolução desenvolveu um sistema de defesa antioxidante endógeno. Constituído por uma cadeia enzimática, composta pelas enzimas superóxidos dismutase- SOD- (SOD1-Citosólica, SOD2-Mitocondrial, SOD3-extracelular), esse sistema de defesa antioxidante é capaz de atuar dismutando o ânion radical superóxido em  $H_2O_2$ , que pode ser detoxificado pelas enzimas Catalase (CAT) e/ou Glutathiona Peroxidase (GPX) (Figura 8). Esse sistema é vital para o organismo, uma vez que se ausente, os danos oxidativos ocasionados por essas moléculas seriam amplos e capazes de induzir a morte do organismo (HALLIWELL, 2007). Com a finalidade de modular os níveis de EROs, o organismo ainda conta com o sistema exógeno, constituído por moléculas bioativas com atividade antioxidante, obtidas a partir da alimentação rica em frutas, verduras e legumes (MONTAGNER, 2010).



Figura 8: Produção de energia metabólica e metabólitos oxidativos (EROS) na mitocôndria. **A.** O citrato da origem ao  $\alpha$ -cetogluturato, sofre uma série de descarboxilações originando o succinato e o fumarato (marcados em negrito verde) sendo estes os principais metabólitos gerados pelo ciclo dos ácidos tricarbóxicos. A energia liberada pela oxidação no ciclo dos ácidos tricarbóxicos através do  $\text{FADH}_2$  e  $\text{NADH}_2$  precisa ser convertida em ATP, via fosforilação oxidativa. **B.** Na cadeia transportadora de elétrons ocorre a fosforilação do NADH e  $\text{FADH}_2$ , para geração de ATP. Este processo é dependente de  $\text{O}_2$  e envolve uma série de complexos carreadores de elétrons. Durante este processo ocorre formação de EROS principalmente de ânion superóxido. **C.** O sistema endógeno de defesa antioxidante composto pelas enzimas SOD, CAT e GPX, catalisa a detoxificação em água e oxigênio das EROS formadas nos processos anteriormente citados.



Fonte: Adaptada de Meng et al., (2014)

## 1.6 INTERFACE ENTRE INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E DEPRESSÃO

Estados de estresse oxidativo podem desencadear inflamação crônica, e subsequentemente doenças psiquiátricas como a depressão e os TEBs. Esse tema é destacado por Tan e colaboradores (2016), em sua revisão, em que as EROS têm papel fundamental na regulação funcional e fenotípica dos macrófagos, além de as espécies reativas terem papel importante no controle da morte celular, proliferação, mobilidade e capacidade fagocítica dos macrófagos. Os autores comentam ainda que as EROS podem estar diretamente relacionadas a regulação da polarização de macrófagos.

Desse modo, cresce de forma exponencial o número de estudos que apontam para o sinergismo da inflamação acompanhada de estresse oxidativo como crucial para a patogênese da depressão (PASCO et al. 2010, GARDNER E BOLES 2011, ALCOCCER-GÓMEZ et al. 2014, ANDERSON E MAES 2014; PASQUALI et al., 2017; MOREIRA et al., 2017; DE MELO et al., 2017).

Devido às características fisiológicas e estruturais do cérebro, bem como a uma alta taxa metabólica de suas células, esse órgão é particularmente suscetível ao estresse oxidativo. Uma consequência importante dos níveis elevados de EROs são os danos ao DNA e o encurtamento telômerico (ANDERSON, 2017).

Alcocer- Gómez e colaboradores (2014) encontraram associação entre depressão, lipoperoxidação e aumento na produção de EROs na mitocôndria, o acréscimo nos níveis de EROs, além de indicar disfunção mitocondrial, pode causar elevação nos danos ao DNA. Lindqvist e colaboradores (2016), confirmaram essa hipótese uma vez que foram encontradas concentrações elevadas de 8 desoxiguanosina (um marcador de dano em DNA) em pacientes depressivos. Anteriormente em 2015, Czarny e colaboradores haviam encontrado associação entre deficiência no reparo e altos níveis lesões no DNA em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes depressivos.

Ainda, elevados níveis de EROs ocasionam danos também no DNA mitocondrial (mtDNA). Gardner e colaboradores (2013), detectaram elevados níveis de deleção no mtDNA isolado dos músculos de pacientes com depressão. Além disso, o número de cópias de mtDNA foi menor, enquanto o nível de 8 desoxiguanosina mitocondrial foi maior nos leucócitos de pacientes deprimidos quando comparado às células de indivíduos controle. Malik e Czajka (2013) já haviam relatado associação entre anormalidades do número de cópias de mtDNA e aumento do estresse oxidativo.

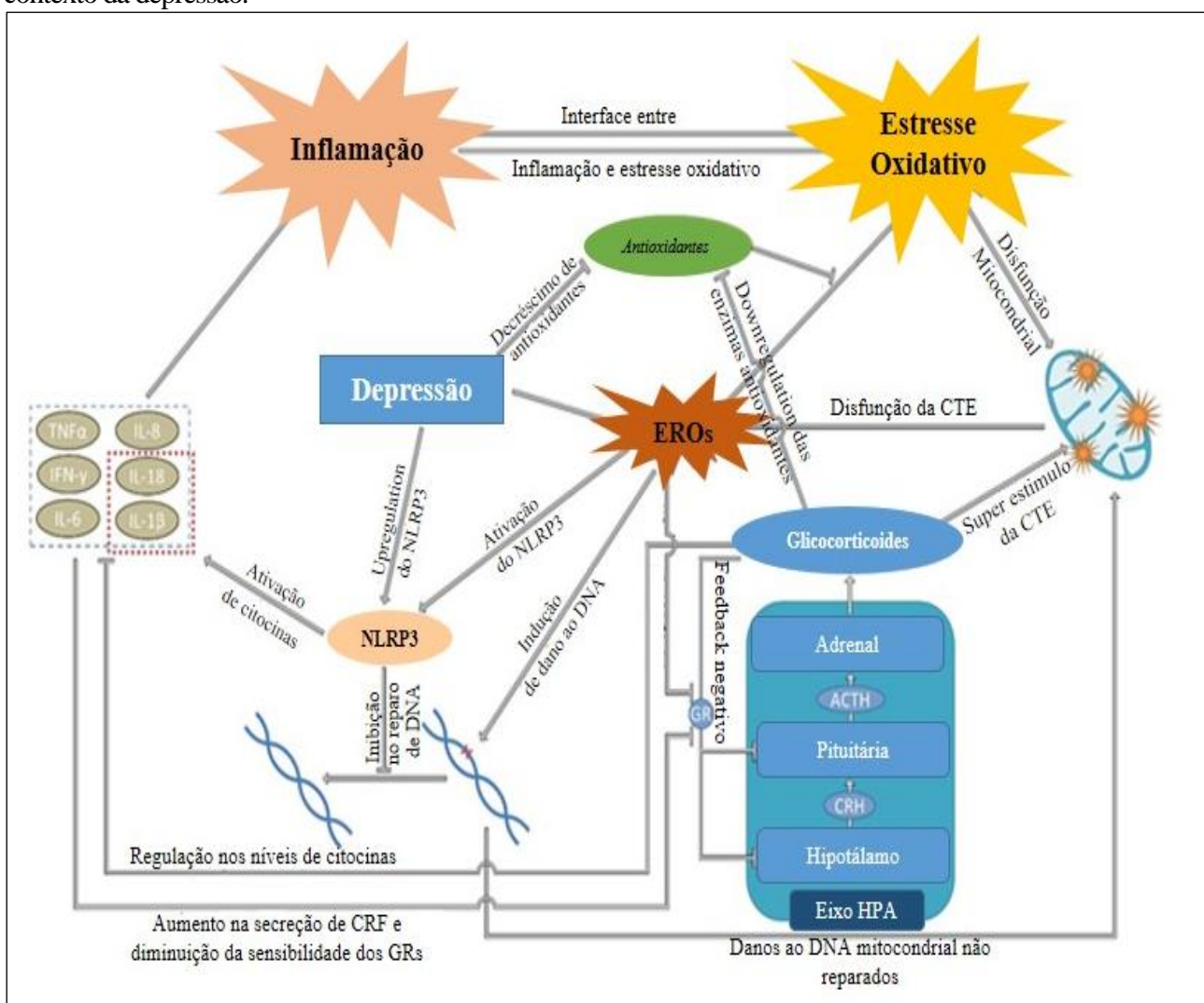
A interface entre estresse oxidativo, depressão e inflamação parece estar a cargo dos inflamassomas. Esses complexos de proteínas citosólicas são formados a partir do reconhecimento de agentes estressores patogênicos ou não. O inflamassoma se liga a pró-caspase 1, induzindo a clivagem da caspase 1 que por sua vez induz a clivagem das formas precursoras de IL-1 $\beta$  e IL-18, desencadeando a ativação da rota inflamatória (Figura 9) (MILLE e RAISON, 2016).

Estudo com ratos expostos a estresse crônico mostrou ativação de DAMPs, de NLRP3 (regulador da formação do inflamassoma) e aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  no sangue e no cérebro. O bloqueio de NLRP3 nos ratos foi capaz de diminuir os níveis de IL-1 $\beta$  nesses tecidos, além de reverter o comportamento depressivo (ZHANG et al., 2015). Iwata e colaboradores

(2013) propuseram uma hipótese, na qual o inflamassoma é um mediador entre estressores psicológicos e fisiológicos relacionados a indução da depressão. Em um estudo com CMSP de pacientes depressivos, o aumento expressão dos genes que codificam NLRP3 e caspase-1 foi acompanhada de níveis elevados de IL-1 $\beta$  e IL-18 no soro (ALCOCER-GÓMEZ et al. 2014), dando força a teoria proposta por Iwata em 2013.

Em resumo, o estresse oxidativo e o reparo do dano do DNA menos eficiente podem levar ao aumento do dano do DNA em pacientes deprimidos. Um mecanismo semelhante pode resultar em disfunção mitocondrial, o que é observado na depressão, ambos os fatores interagem com a inflamação - um ator-chave da patogênese da depressão - provavelmente através do inflamassoma NLRP3 (Figura 9) (CZARNY et al., 2017).

Figura 9: Interface entre inflamação, estresse oxidativo dano e disfunções s no reparo de DNA no contexto da depressão.



Adaptada de: Czarny et al., (2017).

## 1.7 INFLUÊNCIA GENÉTICA ASSOCIADA A DESBALANÇOS OXIDATIVO-INFLAMATÓRIOS

De fato, a inflamação está presente não só no curso da depressão, mas níveis elevados de citocinas inflamatórias podem aumentar o risco de ocorrência do primeiro episódio depressivo (PASCO et al. 2010). Assim, um questionamento que também tem sido investigado, diz respeito a potencial influência genética que predispõe indivíduos ao aumento dos níveis de estresse oxidativo e da inflamação crônica, e em consequência a um maior risco de desenvolvimento da depressão ou TEBs. Tal questão tem sido explorada em estudos epidemiológicos, que sugeriram ocorrência de associação entre alguns genes de marcadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PCR e a predisposição a depressão. Outros achados descreveram também associação entre polimorfismos presentes nos genes das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-11 e a maior ou menor eficácia da terapia com antidepressivos (UHER et al. 2010, BUFALINO et al. 2013). Entretanto, estudos relacionando polimorfismos associados a um desbalanço basal oxidativo, depressão e TEBs são escassos e precisam ser melhor investigados, inclusive em relação a eficácia e segurança dos psicofármacos utilizados nas terapias dessas doenças.

## 1.8 FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS E MODULADORES DO HUMOR

O tratamento farmacológico de TEBs e depressão envolve o uso de antidepressivos e de moduladores de humor.

### 1.8.1 Antidepressivos

Existem diversos tipos de fármacos antidepressivos, dos quais as classes são a seguir comentadas:

**Inibidores de Monoamina oxidase (IMAO):** A primeira classe de antidepressivos descrita foi a dos IMAO, em 1956, com o desenvolvimento a Iproniazida seu mecanismo de ação envolve o bloqueio da enzima monoaminaoxidase (MAO), responsável por degradar monoaminas, assim o bloqueio causa aumento nos níveis das monoaminas na fenda sináptica. Isocarboxazid, Fenelzina e Tranilcipromina são exemplos de fármacos desta classe, entretanto

atualmente são pouco prescritos devido a seus efeitos adversos acentuados (AGUIAR et al., 2011; BRASIL, 2013; VALASQUES JUNIOR, 2015).

**Antidepressivos Tricíclicos (ADTs):** Assim chamados devido a estrutura química com 3 anéis. A Imipramina, primeira droga desta classe foi sintetizada em 1958. Os ADTs são considerados padrão-ouro de eficácia terapêutica e assim fortemente prescrito pelos psiquiatras nas depressões graves. Os ADTs mais prescritos são: Imipramina, Nortriptilina, Clomipramina e Amitrptilina (AGUIAR et al., 2011; BRASIL, 2013; VALASQUES JUNIOR, 2015).

Dentre os múltiplos possíveis mecanismos de ação dos ADTs, destaca-se o bloqueio da captura das aminas (serotonina e noradrenalina) pelas terminações nervosas, por competição pelo sítio de ligação do transportador de aminas (RANG et al., 2012).

Este grupo é indicado principalmente no tratamento de transtornos depressivos, sendo utilizados também na dor crônica, cefaleia e enxaqueca, insônia, transtornos de ansiedade, transtornos obsessivo-compulsivo e transtornos alimentares (BRUNTON et al., 2010).

Assim como outros ADTs, Imipramina e Nortriptilina são metabolizadas no fígado por duas vias principais, N-desmetilação e hidroxilação de anel. Os metabólitos formados comumente retêm a atividade biológica, sendo que, no caso da Imipramina, o principal metabólito é a Desipramina. Durante tratamento prolongado com ADTs, a concentração plasmática desses metabólitos geralmente é comparável à do fármaco de origem, embora haja ampla variação entre os indivíduos. A eliminação ocorre através da urina (RANG et al., 2012).

Podem ocorrer interações medicamentosas com analgésicos, anestésicos, agentes anticolinérgicos, anticoagulantes, anti-hipertensivos, bloqueadores histamínicos H<sub>2</sub> e anticonvulsivantes. No caso da Carbamazepina, esta pode aumentar em até 50% o metabolismo da Imipramina. A associação de ADTs com Levodopa, um antiparkinsoniano, não é recomendada (RANG et al., 2012).

**Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS):** Os ISRS foram desenvolvidos a partir dos ADTs. Como o nome diz agem inibindo a recaptação da serotonina na fenda sináptica, representante mais antigo desta classe, que ainda está no mercado foi descoberto em 1988, a Fluoxetina, até hoje é um dos antidepressivos mais prescritos, outros fármacos pertencentes a este grupo incluem a Paroxetina, a Sertralina e o Escitalopram (AGUIAR et al., 2011; BRASIL, 2013; VALASQUES JUNIOR, 2015).

Os ISRS são indicados para o tratamento de transtornos depressivos, distímia, transtorno do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, transtornos do controle dos impulsos, bulimia nervosa, fobia social, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno disfórico pré-menstrual, enxaqueca e fibromialgia (RANG et al., 2012).

Em relação aos ADTs, os ISRS tem uma janela terapêutica ampliada, e além de mais seguros são menos suscetíveis às interações farmacodinâmicas, entretanto, quando não se leva em conta a tolerabilidade e a segurança os ADTs são possivelmente os antidepressivos com maior eficácia absoluta, por agirem através de múltiplos mecanismos de ação (SILVA, 2010).

Neste estudo serão utilizados os ISRS, Fluoxetina e Escitalopram. O Escitalopram é um isômero S ativo do citalopram racêmico (RANG et al., 2012). De modo similar a outros ISRS, ele alcança a sua ação através da inibição da absorção de serotonina (SANCHEZ et al., 2014), sendo mais eficaz e seguro do que outros membros de sua classe, incluindo o citalopram racêmico, o que poderia explicar sua difusão para o tratamento de depressão e transtornos de ansiedade (PASTOOR; GOBBURU, 2014).

Todos os ISRS sofrem metabolização hepática pelas enzimas do citocromo P450. A Fluoxetina é extensivamente metabolizada pela isoenzima CYP2D6 para Norfluoxetina. A meia-vida é de 24 a 96 horas e a sua eliminação ocorre através da urina (HASNAIN et al., 2016).

O Escitalopram é metabolizado no fígado pelas isoenzimas CYP3A4 e CYP2C19 (e, em menor escala, CYP2D6) em derivados desmetilados e didesmetilados, ambos farmacologicamente ativos. Apresenta meia-vida de 24 a 36 horas, é eliminado através da urina e fezes (RAO, 2007; RANG et al., 2012).

O potencial para interações medicamentosas difere entre os fármacos deste grupo. O principal mecanismo das interações medicamentosas dos ISRS envolve a inibição das isoenzimas do citocromo P450: CYP2D6, CYP3A3/4, CYP1A2, CYP2C9/10 e CYP2C19 (RANG et al., 2012). Por exemplo, a Fluoxetina inibe a atividade das glicoproteínas P, o que pode acarretar em aumento níveis plasmáticos da Carbamazepina um substrato desta glicoproteína, assim a associação Fluoxetina/Carbamazepina apesar de ser utilizada, não é recomendada (SILVA, 2010).

A escolha do antidepressivo a ser utilizado envolve: avaliar os efeitos adversos (sedação, taquicardia, tremores, sudorese, boca seca) comparar os ADTs com ISRS, possíveis interações medicamentosas com outros fármacos que o paciente já utiliza. Inibidores da MAO somente são utilizados em pacientes que não responderam a outros tratamentos. O Sistema Único de Saúde –SUS- disponibiliza gratuitamente os fármacos Fluoxetina, Amitriptilina, Clomipramina e a Nortriptilina (VALASQUES JUNIOR, 2015; BRASIL, 2015).

## 1.8.2 Estabilizadores de Humor

Os estabilizadores de humor são utilizados no tratamento de mania, hipomania, justamente para controlarem as oscilações de humor dos indivíduos evitando-se assim episódios maníacos e/ou depressivos (RANG et al., 2012). Em estudos na população geral as prevalências ao longo da vida da mania e da hipomania foram estimadas respectivamente em 0,5% a 3,3% e 0,3% a 10,5% (MERIKANGAS et al., 2011). O tratamento depende das características do episódio e objetiva a remissão dos sintomas agudos visando à estabilização, prevenindo a depressão que costuma se seguir a um episódio maníaco. Em casos graves pode significar uma urgência psiquiátrica, devido à intensidade das alterações do humor e psicomotoras, e dos sintomas psicóticos (RANG et al., 2012).

O Lítio é o estabilizador de humor de uso padrão utilizado no tratamento e na profilaxia de episódios agudos tanto maníacos como depressivos dos TEBs, como potencializador dos antidepressivos em pacientes com depressão maior unipolar, que apresentam baixa resposta terapêutica a antidepressivos, em episódios de agressividade e de descontrole do comportamento, e ainda em pessoas com risco de suicídio (RANG et al., 2012).

### 1.8.2.1 Lítio

O Lítio foi introduzido na psiquiatria em 1949, por John Cade como um tratamento eficaz para mania, e desde então este metal alcalino tornou-se a farmacoterapia clássica para doenças com variação de humor (CROSSLEY e BAUER, 2007).

É fundamental ressaltar aqui, que embora o lítio seja considerado o tratamento de primeira linha para os TEBs, uma grande porcentagem dos pacientes tratados não são bom respondedores (cerca de 40 a 50%). Muito se especula que o lítio teria seu efeito modulado por fatores genéticos e iniciativas colaborativas como o Consórcio Internacional sobre a Genética do Lítio (ConLiGen) buscam identificar variações genéticas associadas a diferentes respostas no tratamento, permitindo assim uma maior eficácia farmacológica.

Ainda, é preciso ter atenção com a estreita janela terapêutica do Lítio (0,5 – 1,5 mmol/L), o que exige o acompanhamento via exames laboratoriais da sua concentração plasmática, visando a não ocorrência de efeitos tóxicos como edema, tremor, transtornos gastrointestinais e renais (NASSAR e AZAB, 2014).

O mecanismo de ação do Lítio, como um estabilizador de humor ainda não é uma unanimidade entre os pesquisadores, e várias hipóteses têm sido sugeridas e pesquisadas, destacando-se: esgotamento dos níveis de inositol no cérebro; modulação da sinalização monoaminérgica com indução da síntese e liberação de serotonina, modulação da via do cAMP e proteína G, indução do sistema de autofagia celular, e talvez a hipótese mais aceita inibição da glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3 $\beta$ ) (NASSAR e AZAB, 2014; ALDA 2015). Existem também fortes evidências do que o lítio atua no sistema imune, com atividade anti-inflamatória que poderia estar diretamente associada a sua eficácia.

### 1.9 ATUAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS NO METABOLISMO OXIDATIVO-INFLAMATÓRIO

Os estudos acerca do papel dos psicofármacos no metabolismo oxidativo e inflamatório ainda são controversos, não havendo consenso sobre os efeitos dos psicofármacos no desbalanço oxidativo e ativação inflamatória (BAUMEISTER et al., 2016).

Marques-Deak e colaboradores (2007), em sua investigação que incluiu 87 mulheres, demonstraram que os antidepressivos induziram inflamação sistêmica, com aumento nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ . Kubera e colaboradores (2004), em estudo com pacientes tratados com os antidepressivos Imipramina e Venlafaxina, observaram aumento nos níveis de IL-6 durante o tratamento com esses fármacos.

Por outro lado, Kim e colaboradores (2007), observaram uma diminuição significativa na produção de IL-2, IL-6, e TGF- $\beta$ 1, após o tratamento com antidepressivos de diferentes classes em 32 pacientes com depressão maior. Entretanto, os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4 e TNF- $\alpha$  não se alteraram significativamente nos mesmos. Por outro lado, Hiles e colaboradores (2012) descreveram diminuições significativas nas concentrações de IL-6 e PCR, em consequência do tratamento com antidepressivos, mas nenhuma mudança nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 foi observada no estudo.

No estudo de Herbert et al (2015), 14 ratos foram tratados por 10 dias com Fluoxetina (10mg/Kg), para análise de capacidade antioxidante total e atividade das enzimas antioxidantes. Ao final, os resultados mostraram que o fármaco não foi capaz de causar nenhum efeito sobre os parâmetros oxidativos analisados. Jiménez-Fernández e colaboradores (2015) realizaram uma meta-análise buscando avaliar o estresse oxidativo e parâmetros antioxidantes em pacientes com transtorno depressivo maior, em comparação com controles saudáveis antes e



após o tratamento com antidepressivos. Foram incluídos 29 estudos perfazendo um total de 3.961 pacientes, sendo que 2.477 pacientes com depressão e 1.484 controles saudáveis, a conclusão mostra que pacientes depressivos apresentam maiores níveis de estresse oxidativo em relação aos controles saudáveis.

Baumeister et al., (2016) em sua revisão sobre efeitos de psicotrópicos em marcadores inflamatórios comentam que alguns antidepressivos, como a Clomipramina e Fluoxetina, tem a capacidade de diminuir citocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , enquanto outros como a Mirtazapina e Venlafaxina tendem a aumentar os níveis dos mesmos marcadores.

Ilgin e colaboradores (2017), em uma investigação realizada com ratos machos tratados por 28 dias com escitalopram verificaram a ocorrência de estresse oxidativo acompanhando de indução de dano testicular e alterações hormonais. Em seu estudo Dong e colaboradores (2016) sugerem que o escitalopram, mas não o R-citalopram e a reboxetina, tem efeitos anti-inflamatórios e antidepressivos em modelo de depressão induzida por LPS em ratos e que a reboxetina pode antagonizar os efeitos do escitalopram no modelo de inflamação.

Investigações em seres humanos, do tipo ensaio clínico também têm sido conduzidas a fim de avaliar o impacto dos psicofármacos na modulação inflamatória. Por exemplo, Uher e colaboradores (2014), realizaram estudo multicêntrico para verificar se os níveis de PCR eram capaz de prever resposta diferencial ao escitalopram e/ou em pacientes com transtorno depressivo. Os resultados mostraram que para pacientes com níveis baixos de PCR (<1 mg / L), a resposta ao tratamento foi mais eficaz com escitalopram do que com nortriptilina. Já, para os pacientes com maiores níveis de PCR (>1mg/L) a melhor resposta terapêutica se deu ao tratamento com nortriptilina.

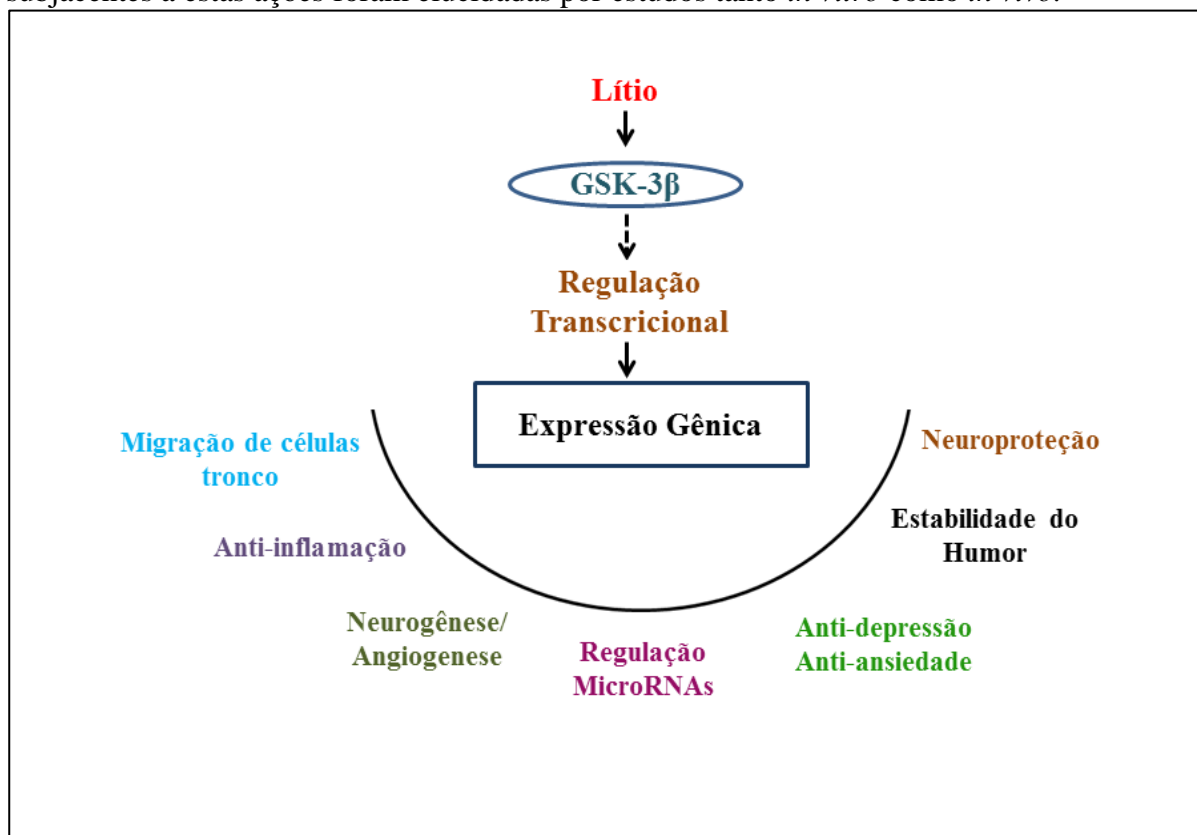
O conjunto das informações apresentadas até aqui, demonstram que o papel dos fármacos na modulação do metabolismo oxidativo-inflamatório é bastante complexo e investigações de potenciais variáveis intervenientes, sejam endógenas (genéticas) ou exógenas (por exemplo, fatores relacionados ao estilo de vida), precisam ser mais estudadas e analisadas.

### **1.9.1 Efeito do lítio no metabolismo inflamatório**

De todos os mecanismos propostos para a ação do Lítio, destaca-se a sua capacidade de inibir a enzima GSK-3 $\beta$ . Essa enzima modula diversos processos no organismo uma vez que é capaz fosforilar e, deste modo, regular cascatas de sinalização intracelular. Vários sistemas de neurotransmissores também recebem ação direta da GSK-3 $\beta$ , incluindo a via serotoninérgica, dopaminérgica, colinérgica, e glutamatérgica (CHIU et al., 2013).

Devido à regulação da GSK-3 $\beta$  nos sistemas de neurotransmissores, essa enzima tem sido associada com as desordens de humor, transtorno bipolar, depressão, e SCZ. Assim acredita-se que inibição da GSK-3 $\beta$  possa ser um alvo terapêutico importante para o tratamento desses transtornos. E, explicaria a ação terapêutica do Lítio, uma vez que ao inibir esta enzima há um efeito em cascata numa gama de funções celulares e fisiológicas (Figura 10) (CHIU et al., 2013).

Figura 10: Principais ações moleculares do Lítio via inibição de GSK-3 $\beta$ . Os mecanismos subjacentes a estas ações foram elucidadas por estudos tanto *in vitro* como *in vivo*.



Fonte: Adaptada de CHIU et al., 2013.

Em estudos com modelos de ratos utilizando a inibição farmacológica ou o silenciamento do gene da GSK-3 $\beta$ , os efeitos antidepressivos e anti-maníacos nos animais foram bastante similares àqueles observados quando os mesmos eram tratados com Lítio (ROSA et al., 2008; JOPE, 2011; OMATA et al., 2011).

A GSK-3 $\beta$  parece atuar interferindo na via dos TLRs, uma família de receptores transmembrana que compõe o sistema imune inato, os TLRs são expressos principalmente em células apresentadoras de antígeno como monócitos-macrófagos e células dendríticas. Os TLRs tem a capacidade de reconhecer e responder aos distintos PAMPs (MARTIN et al., 2005; BEUREL, 2011).

Martin e colaboradores (2005), demonstraram que a GSK-3 $\beta$  exerce modulação na resposta a ativação de receptores do tipo Toll (TLRS, do inglês *Toll-like receptors*) em

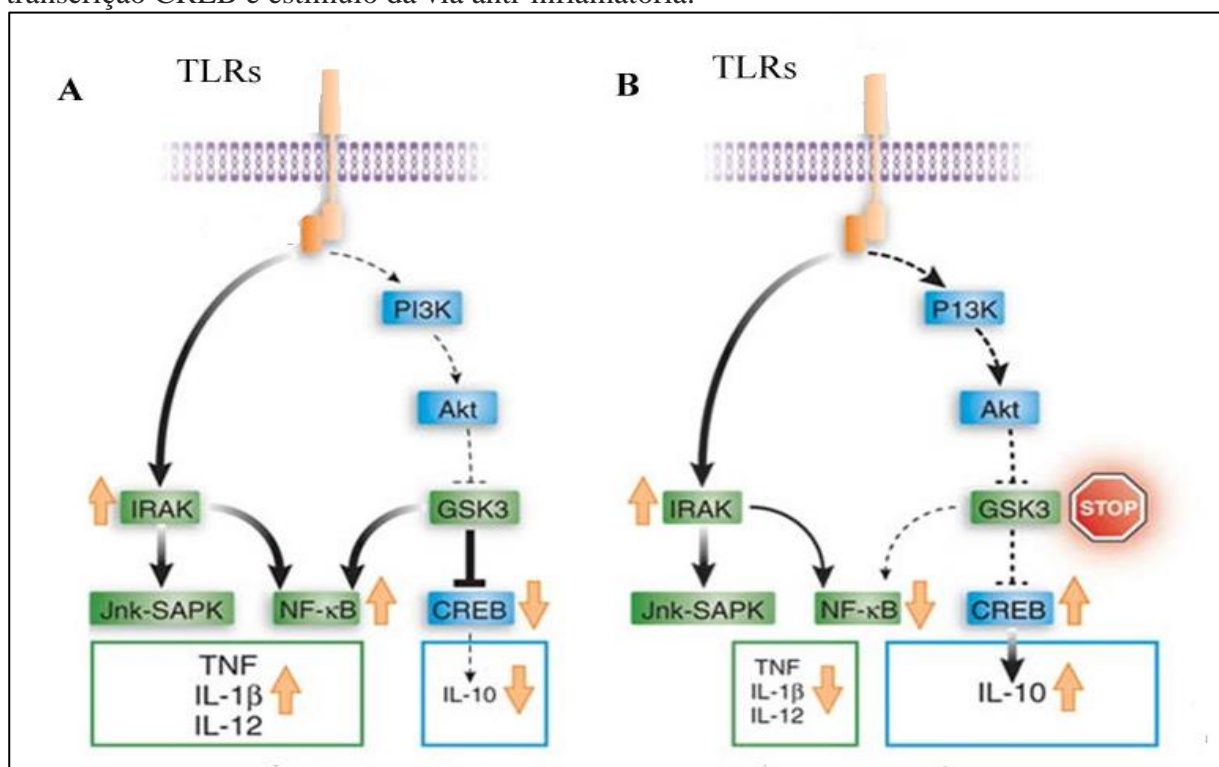
monócitos e células mononucleares do sangue periférico. Demonstrando que a ação da GSK-3 $\beta$  é necessária para estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$ . Dessa forma, a inibição da GSK-3 $\beta$  reduz fortemente a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Os TLRs regulam a magnitude e a duração da resposta inflamatória. A GSK-3 $\beta$  atua modulando diferencialmente a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias na cascata inflamatória iniciada pelo TLRs agindo simultaneamente na supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias. A GSK-3 $\beta$  regula a resposta inflamatória por afetar diferencialmente o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (MARTIN et al., 2005; WOODGETT e OHASHI, 2005). Os fatores de transcrição CREB (*cAMP response element-binding protein*) e NF- $\kappa$ B competem pelo mesmo co-ativador. Com a inibição da GSK-3 $\beta$ , CREB passa a competir com vantagem em relação ao NF- $\kappa$ B pelo co-ativador CBP. Com a queda na disponibilidade de co-ativador, automaticamente diminui a ativação de NF- $\kappa$ B e conseqüentemente não há sinais para que ocorra o aumento da expressão gênica de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias, logo a resposta inflamatória é inibida (Figura 11) (WOODGETT e OHASHI, 2005).

Esses possíveis mecanismos de ação são comprovados por estudos como o de Martin e colaboradores (2005), em que ratos machos de 8 a 12 semanas foram tratados intraperitonealmente com 10 $\mu$ g/G de lipopolissacarídeo (LPS), uma dose normalmente letal, e com inibidores da GSK-3 $\beta$ : azakenpaullone e cloreto de lítio. A sobrevivência dos ratos foi monitorada por 10 dias. Os resultados deste estudo demonstram que a inibição de GSK-3 $\beta$  afeta diferencialmente a natureza e magnitude da resposta inflamatória. A inibição da GSK-3 $\beta$  resultou num aumento acentuado da produção de IL-10 e substancial redução de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Demonstrando a capacidade de inibidores da GSK-3 $\beta$  em modular a resposta inflamatória, revelando assim o potencial efeito terapêutico de inibidores de GSK-3 $\beta$  em patologias que envolvem ativação inflamatória.

Em relação a IL-1 $\beta$ , Kucharz et al., (1988) relataram que o Lítio era capaz de induzir aumento de IL-1 $\beta$  em monócitos do sangue periférico. Da mesma forma, Liu e colaboradores (2011) demonstraram que o Lítio era capaz de induzir aumento da síntese de IL-1 $\beta$  em células dendríticas humanas. Entretanto, estudos realizados por Park et al, (2009); Tan et al., (2010); Zhu et al., (2010); Greenn et al., (2012); Himmerich et al., (2013) demonstram que o Lítio inibe a produção de IL-1 $\beta$ .

Figura 11: TLR induz a ativação de múltiplas vias que medeiam respostas pró-inflamatórias. A- Estímulos agressores levam a ativação inflamatória via IRAK-NF- $\kappa$ B. Nesta situação, ocorre o estímulo a GSK3 que modula positivamente o NF- $\kappa$ B, ocasionando favorecimento a fatores pró-inflamatórios. (B) A inibição de GSK3 leva a redução de NF- $\kappa$ B, aumento do fator de transcrição CREB e estímulo da via anti-inflamatória.



Fonte: Adaptada de: Woodgett e Ohashi, 2005.

Sabe-se que o metabolismo oxidativo e inflamatório tem uma estreita relação, e que estresse oxidativo e inflamação são quadros quase sempre concomitantes e que se retroalimentam. No sentido do metabolismo oxidativo, De Sousa (2014), em sua tese de doutorado realizou estudo com 31 pacientes e concluiu que o tratamento com Lítio tem efeito antioxidante e protetor para os sintomas de TEBs. O Lítio potencializa a queda de marcadores do estresse oxidativo nos pacientes tratados, e esta via poderia ser útil na explicação de como o Lítio controla os sintomas depressivos.

Ainda em relação aos efeitos antioxidantes em estudos *in vitro*, a administração de Lítio inibiu a morte celular induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bem como diminuiu a lipoperoxidação e a oxidação das proteínas (DE VASCONCELLOS et al, 2006; CUI et al., 2007; FREY et al, 2007; MACHADO-VIEIRA et al, 2007; KIM et al, 2011). A capacidade antioxidante do Lítio também foi constatada com aumento nos níveis de glutathiona em neurônios dopaminérgicos (N27), e

células de neuroblastoma SH-SY5Y humanas (DE VASCONCELLOS et al, 2006; KIM et al, 2011).

Dell'Osso e colaboradores (2016), comentam que a GSK-3 $\beta$  é uma quinase chave na regulação do equilíbrio entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias Tanto no sistema nervoso central quanto periférico, com capacidade de influenciar a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células T, de modo que sua inibição determina efeitos anti-inflamatórios.

Luca e colaboradores (2016), em sua revisão de literatura discutiram a ligação entre a enzima GSK-3 $\beta$  e as principais alterações biológicas demonstradas nos TEBs, os autores citam que a inibição da enzima pelo lítio poderia, pelo menos em parte, explicar seu efeito positivo sobre essas disfunções biológicas e sua superioridade em termos de eficácia clínica, em comparação a outros estabilizadores de humor.

## 1.10 POTENCIAL INFLUÊNCIA DE FATORES GENÉTICOS, DIETÉTICOS E FARMACOLÓGICOS NA AÇÃO ANTIINFLAMATORIA DO LÍTIO

O efeito anti-inflamatório do lítio tem sido destacado como um dos grandes aspectos benéficos associados ao seu uso terapêutico nos pacientes com transtorno de humor e também como potencial fármaco aplicado a outras doenças neurodegenerativas. Entretanto, a maior parte dos estudos conduzidos consideraram somente o efeito isolado do lítio no sistema imunológico, e não potenciais interações com fatores genéticos intrínsecos aos pacientes, dietéticos e farmacológicos, em especial aos antidepressivos que são muitas vezes utilizados de modo concomitante.

### 1.10.1 Fatores genéticos: polimorfismo Val16Ala-SOD2

Apear de os estabilizadores de humor serem a primeira linha para o tratamento dos TEBs, e o lítio ser o fármaco destaque, McCarthy e colaboradores (2010), relatam que a resposta terapêutica ao lítio não é universal. Licht e colaboradores, ainda no ano de 2001, em um estudo prospectivo longitudinal de 2 anos, em pacientes com TEB tratados com lítio, demonstraram que 22% tiveram episódios de alteração de humor recorrente e em 20% dos pacientes os efeitos colaterais do lítio, forçaram a troca da medicação.

Hou e colaboradores (2016), citam que 30% dos pacientes são parcialmente responsivos, e outros 30% praticamente não apresentam resposta clínica ao fármaco. Evidências sugerem que parte da variabilidade da resposta ao lítio tem uma base genética, entretanto o tamanho das

amostras nos estudos farmacogenéticos têm sido pequenos (GROF et al., 2002; KLEINDIENST et al., 2005; DUFFY et al., 2007). Hou e colaboradores (2016), comentam que o estudo de marcadores genéticos de resposta ao lítio poderiam fornecer uma valiosa visão para uma maioria eficaz no tratamento.

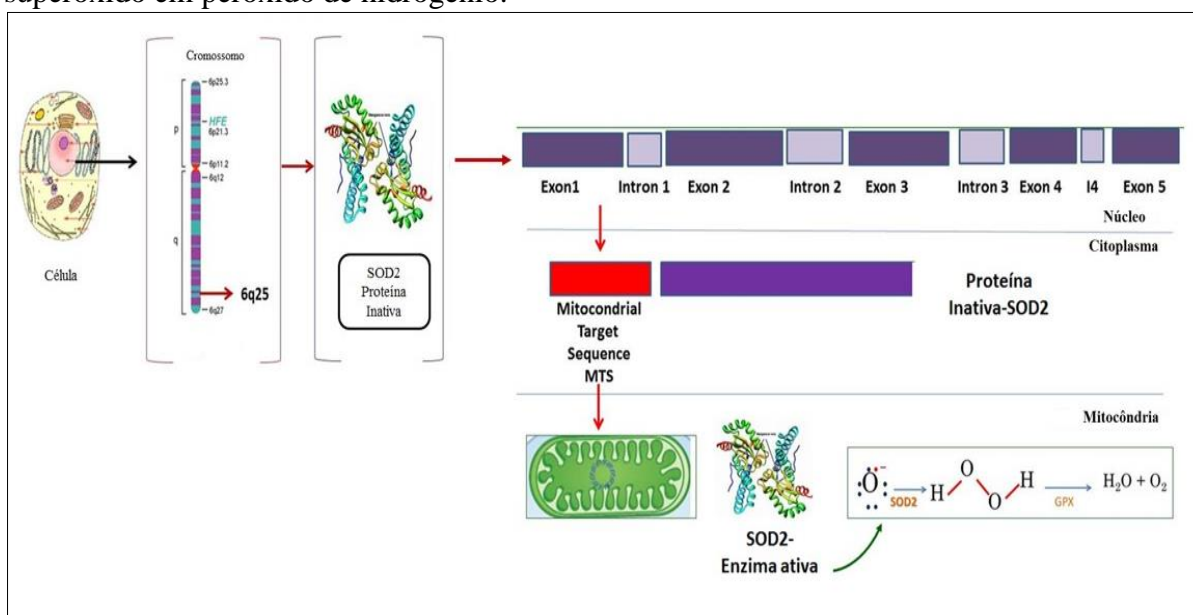
Estudos farmacogenéticos em geral se concentram em genes supostamente envolvidos com a ação terapêutica do lítio, entretanto ainda não surgiram resultados replicáveis (HOU et al., 2016). Estudos sobre variantes genéticas associadas a resposta oxidativo-inflamatória, ainda não foram conduzidos.

Uma variante genética que poderia afetar a resposta farmacológica do lítio na sua ação oxidativo-inflamatória seria um polimorfismo pontual (rs4880) localizado códon 16 do gene da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2), denominado Val16Ala-SOD2. Isto porque tal variante está associada a produção de um desbalanço nos níveis de superóxido e peróxido de hidrogênio (S-PH) (BRESCIANI et al., 2013, BARBISAN et al., 2017).

As SODs são uma família de enzimas que catalisam a dismutação do ânion  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , que serve de substrato para as próximas enzimas da via antioxidante, como a CAT e GPX, resultando em água e oxigênio. Três isoformas da SOD foram bioquímica e molecularmente caracterizadas em mamíferos até o momento: duas enzimas dependentes do cobre e do zinco como co-fatores (SOD1 e SOD3) e uma enzima dependente do manganês como co-fator: SOD2 ou MnSOD (BRESCIANI et al., 2013).

A SOD2 é a enzima superóxido dismutase mais relevante por atuar dentro da mitocôndria, na qual ocorre a maior produção de espécies reativas, a SOD2 é uma molécula homotetramétrica composta por tetrâmeros de aproximadamente 21 kDa por subunidade. Tal enzima é codificada pelo gene SOD2 nuclear, localizada no cromossomo 6 região q25.3. Como essa enzima é sintetizada a partir de um gene nuclear, inicialmente é produzida uma proteína SOD2 inativa que estruturalmente é homotetrâmero, o qual se liga a um íon de manganês por subunidade. Assim, a SOD2 inativa sintetizada no retículo endoplasmático rugoso é enviada para o interior da mitocôndria graças a presença de uma pequena sequência peptídica denominada sequência mitocondrial alvo (do inglês: *mitochondrial target sequence*, MTS). Ao passar pelos poros da membrana mitocondrial interna, o segmento peptídico MTS é então clivado por lisossomos, e a proteína madura se agrega em uma forma ativa tornando-se uma enzima funcional (Figura 12) (ZELKO et al., 2002; SUTTON et al., 2003).

Figura 12: Da codificação a ativação da enzima SOD2. A SOD2 é sintetizada a partir de um gene nuclear localizada no cromossomo 6, braço longo região 6q25, sintetizada no retículo endoplasmático rugoso como proteína inativa, contendo uma pequena sequência peptídica denominada sequência mitocondrial alvo (MTS), a qual direciona a proteína SOD2 até a mitocôndria, ao passar pelo poros de tal organela a região MTS é degradada pelos lisossomos e a proteína assume a forma de enzima SOD2 ativa, agindo na detoxificação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio.



Fonte: A autora desta Tese

Ao contrário das outras SODs, a atividade da SOD2 é essencial para a sobrevivência dos mamíferos, como mostrado em uma investigação com camundongos geneticamente modificados que não possuíam o gene da SOD2 (*Knockout*), apresentarem alterações morfofuncionais importantes, incluindo miocardiopatia dilatada e neurodegeneração e morreram logo após o nascimento devido ao dano oxidativo exacerbado (LI et al., 1995).

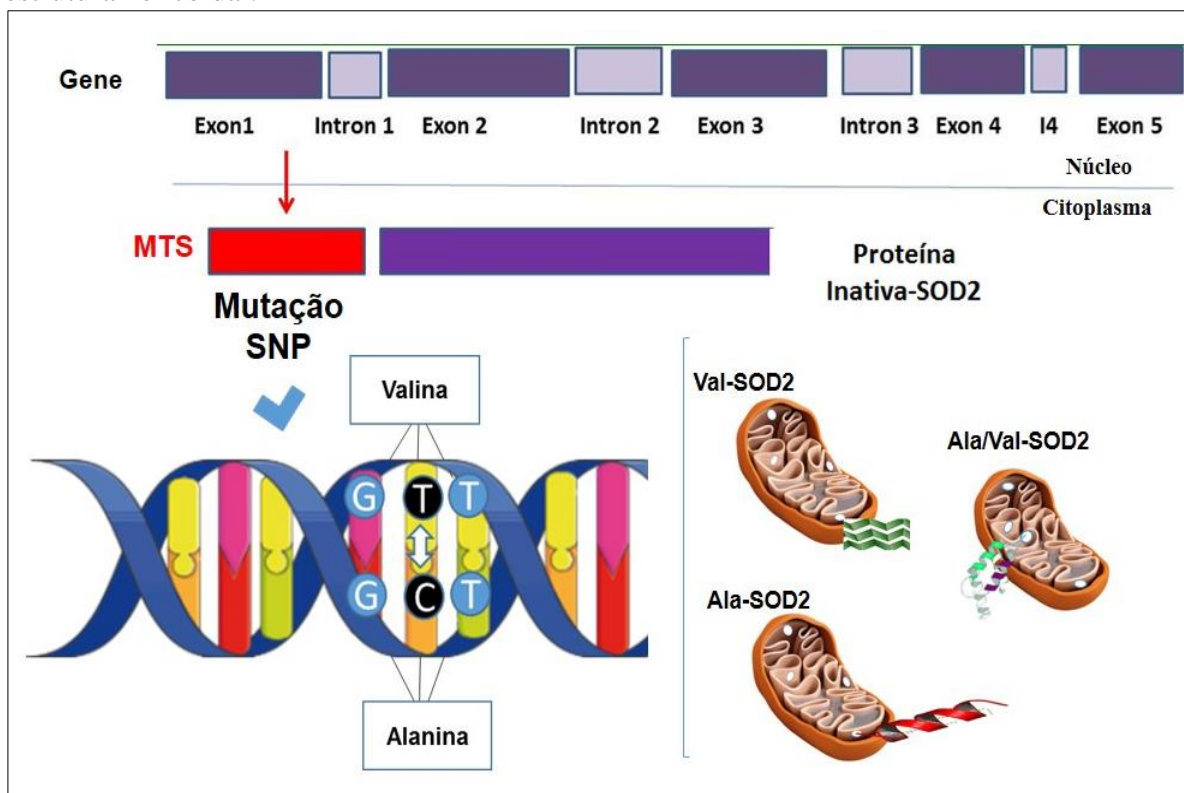
Assim, por ser um gene vital para a sobrevivência, foi postulado que variações genéticas que afetassem a eficiência da SOD2 poderiam alterar o balanço redox celular e estarem associadas a disfunções e doenças crônico-degenerativas. Desse modo, durante a década de 90, investigações sobre o papel de polimorfismos genéticos na SOD2 em doenças humanas começaram a emergir. Um dos primeiros estudos sugeriu potencial associação entre variações genéticas da SOD2 com diabetes insulino-dependente (POCIOT et al., 1993). Já em 1999, um estudo conduzido por Ambrosone e colaboradores descreveu a associação entre um polimorfismo localizado na região MTS e câncer de mama.

O polimorfismo estudado por Ambrosone (1999), é do tipo SNP (do inglês *single nucleotide polymorphism*), polimorfismo que envolve a troca de um único nucleotídeo. Nesse caso ocorre a substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) no exon 2, nucleotídeo 47. Tal

substituição afeta o códon 16, que codifica o aminoácido 9, resultando na substituição do aminoácido valina (GTT) pela alanina (GCT). Por esse motivo, esse polimorfismo é denominado Val16Ala-SOD2 (ZELKO et al., 2002)

Assim, existem dois alelos A (Alanina) e V (Valina), e portanto três possíveis genótipos: AA, AV e VV. Em termos fenotípicos, a variante Ala-SOD2 possui uma estrutura  $\alpha$ -hélice, sendo assim facilmente importada para o interior da mitocôndria. Já a variante Val-SOD2 possui uma estrutura parcial de  $\beta$ -lâmina, o que faz com que fique parcialmente retida no poro da membrana interna mitocondrial. A variante Ala/Val-SOD2 apresenta estrutura helicoidal (Figura 13) (SUTTON et al., 2003, BAG e BAG, 2008).

Figura 13: Polimorfismo Val16Ala-SOD2, envolve a troca de um nucleotídeo timina (T) por uma citosina (C) a substituição afeta a formação do aminoácido valina (GTT) ocorrendo a troca pela alanina (GCT). Em termos fenotípicos, a variante Ala-SOD2 possui uma estrutura  $\alpha$ -hélice, a Val-SOD2 possui uma estrutura parcial de  $\beta$ -lâmina, e a variante Ala/Val-SOD2 apresenta estrutura helicoidal.



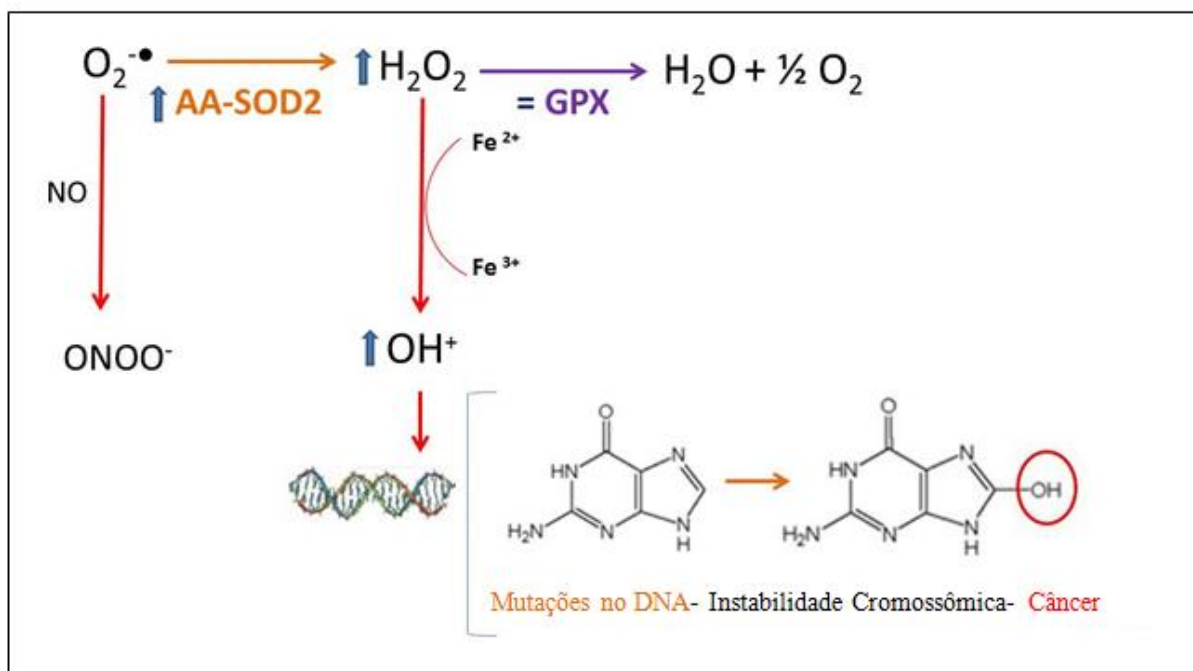
Fonte: A autora desta Tese

Investigações *in vitro* demonstraram que o Ala-SOD2 é capaz de gerar homotetrâmeros SOD2 com 30-40% mais atividade do que a matriz processada com precursor Val-SOD2 (SUTTON et al., 2003; MONTIEL et al., 2013). Apesar da maior eficiência do alelo A, estudos epidemiológicos têm descrito associação entre essa variante genética ao câncer de próstata



(TAUFER et al., 2005), agressividade do câncer de próstata (MIKHAK et al., 2006) Linfoma não-Hodgkin (WANG et al., 2006), mama (BICA et al., 2009), pulmão e estômago (ZEJNILOVIC et al., 2009). Acredita-se que esse fenômeno ocorra devido a maior eficiência da SOD2, que se não for acompanhada por um aumento nos níveis de CAT e GPX, ou de compostos antioxidantes não enzimáticos armazenados na célula, resulta na geração excessiva de  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  pode reagir com metais de transição via reação de Fenton, originando o radical  $OH^\bullet$ , que é o mais lesivo dos radicais e é fortemente mutagênico, e contra o qual o organismo não apresenta mecanismos de defesa. (Figura 14).

Figura 14- Representação esquemática reações bioquímicas associadas ao genótipo AA. Potencial associação entre o genótipo AA do polimorfismo Ala16Val-SOD2 com a produção de níveis elevados de hidroxila, que estão associados a danos ao DNA e ao risco aumentado de câncer. No caso, a maior taxa de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , devido a solubilidade do  $H_2O_2$  nas membranas e no citoplasma, pode reagir via reação de Fenton originando altos níveis de  $OH^\bullet$ .

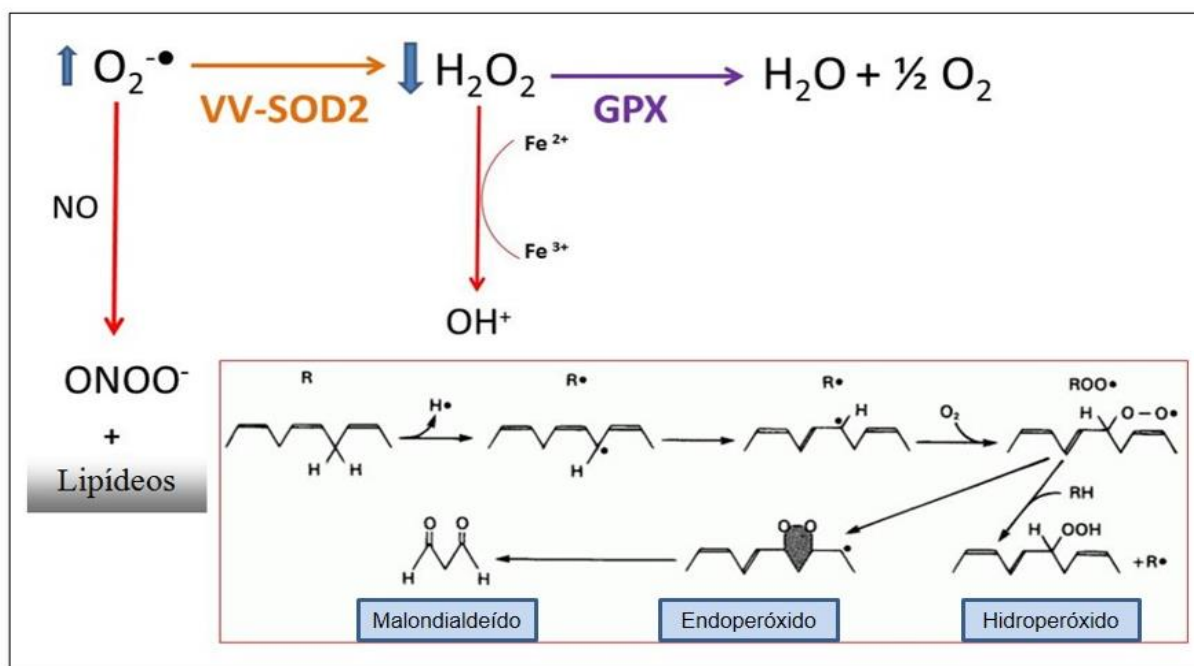


Fonte: A autora desta Tese

Uma revisão sobre a associação entre o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e disfunções e morbidades foi conduzida por Bresciani e colaboradores (2013), são citadas evidências de que o genótipo VV, que possui menor eficiência enzimática da SOD2 e, com isso, acúmulo do ânion radical  $O_2^{\bullet-}$  dentro da mitocôndria, rapidamente reage com o ON formando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Essa molécula tem grande afinidade com lipídios, causando extensa oxidação das membranas celulares (Figura 15).

Assim, o genótipo VV-SOD2 tem sido associado com disfunção endotelial (KATO, 2000), níveis elevados de LDL-oxidado (GOTTLIEB et al., 2005), maior risco de desenvolvimento de obesidade (MONTANO et al., 2009), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010) maior agressividade tumoral, já que aumenta o potencial de metástase no câncer de mama (BICA et al., 2010), a complicações microvasculares do diabetes (TIAN et al., 2012), níveis elevados de citocinas inflamatórias (MONTANO et al., 2012). O genótipo VV-SOD2 também é considerado fator de risco para a asma brônquica (DESPOTOVIC et al., 2015), cirrose alcoólica (HUANG et al., 2016), e hipertensão arterial pulmonar (XU et al., 2017).

Figura 15- Representação esquemática reações bioquímicas associadas ao genótipo VV. Potencial associação do genótipo VV com maiores níveis de lipoperoxidação que causam danos as membranas plasmática e das organelas. A menor eficiência na taxa de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  faz com que haja acumulo de  $O_2^{\bullet-}$  na mitocôndria. Uma vez que virtualmente todas as células produzem ON, e que o  $O_2^{\bullet-}$  possui alta afinidade por esta molécula, a reação entre  $O_2^{\bullet-}$  e ON produz ONOO- que pode causar extensa lipoperoxidação das membranas.



Fonte: A autora desta Tese

Investigações *in vitro* também demonstraram que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 afeta diferencialmente a toxicidade de linfócitos expostos a radiação ultravioleta (MONTAGNER et al., 2010), ao metilmercúrio (ALGARVE et al., 2014) e a campos magnéticos estáticos (DORNELLES et al., 2016).

O polimorfismo parece ainda interferir na farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos como: quimioterápico ciclofosfamida (GLYNN et al., 2009), citrato de clomifeno, um inibidor do receptor do estrogênio, amplamente utilizado como indutor da ovulação (COSTA et al.,

2012), quimioterápico metotrexato (BARBISAN et al., 2014), resposta aos agentes da platina e fluoracil em pacientes com câncer gástrico (XU et al., 2015).

Estudos recentes criaram um modelo farmacológico de desbalanço S-HP onde o paraquat foi utilizado para elevar os níveis de superóxido e a porfirina para elevar os níveis de peróxido de hidrogênio, uma vez que essa molécula é considerada similar a SOD2 ou SOD-like. Este modelo foi testado em células de câncer coloretal e de próstata mostrando que o desbalanço S-HP afeta diretamente a sobrevivência, proliferação e resistência a quimioterápicos (BERTO et al., 2015; AZZOLIN et al., 2016).

Evidências também têm sugerido que o genótipo VV, estaria associado a maior quantidade de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas por CMSP cultivadas *in vitro* (MONTANO et al., 2012). Capeleto e colaboradores (2015), realizaram estudo com CMSP, expostas ao resveratrol, uma molécula com ação antioxidante e anti-inflamatória, e o resultados mostraram uma resposta menos intensa ao resveratrol em células portadoras do genótipo VV.

Duarte e colaboradores (2016), realizaram estudo com pacientes hipercolesterolêmicos tratados com Rosuvastatina (20 mg) e os resultados mostraram menor resposta farmacológica em indivíduos VV, além de menor a ação anti-inflamatória do fármaco.

Akyol e colaboradores (2005), associaram o genótipo AA a maior risco de desenvolvimento de esquizofrenia. Zhang et al., (2014), demonstraram maior disfunção cognitiva em pacientes AA. Dong-Fang-Wang e colaboradores (2015), em sua metanálise concluíram que a diminuição da atividade da SOD2 pode estar associada ao risco de esquizofrenia crônica na população chinesa.

Diante do importante papel que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 parece exercer frente ao desenvolvimento de doenças e respostas a fatores ambientais e fármacos, uma interação entre o efeito terapêutico do lítio e este polimorfismo seria plausível.

### **1.10.2 Fatores dietéticos: bebidas ricas em xantinas-catequinas**

Alguns compostos de origem natural com promissora atividade em nível de transtornos mentais são a curcumina (*Curcuma longa* Turmeric) e o chá-verde (*Camellia sinensis* L. Kuntze), coincidentemente ou não, ambos apresentam altos níveis de catequinas (YU et al., 2015).

Com base na ideia de que administração repetida de corticoides induz a desregulação do eixo HPA e resulta em depressão e ansiedade. Lee e colaboradores (2013) administraram catequina (presente no chá verde e na maioria das bebidas cafeinadas) em ratos machos 1 hora

antes da injeção diária de corticoide durante 21 dias. A administração diária de catequina diminuiu significativamente marcadores inflamatórios e melhorou significativamente o comportamento exploratório dos animais. Portanto, a catequina pode ser um agente útil para o tratamento ou alívio dos sintomas associados a desordens de ansiedade e depressão. Ainda em relação à catequina Ashafaq e colaboradores (2012), utilizando modelo de reperfusão isquêmica em ratos, mostraram que a catequina é capaz de regular a resposta inflamatória via diminuição da expressão de NF- $\kappa$ B e iNOS (óxido nítrico induzível).

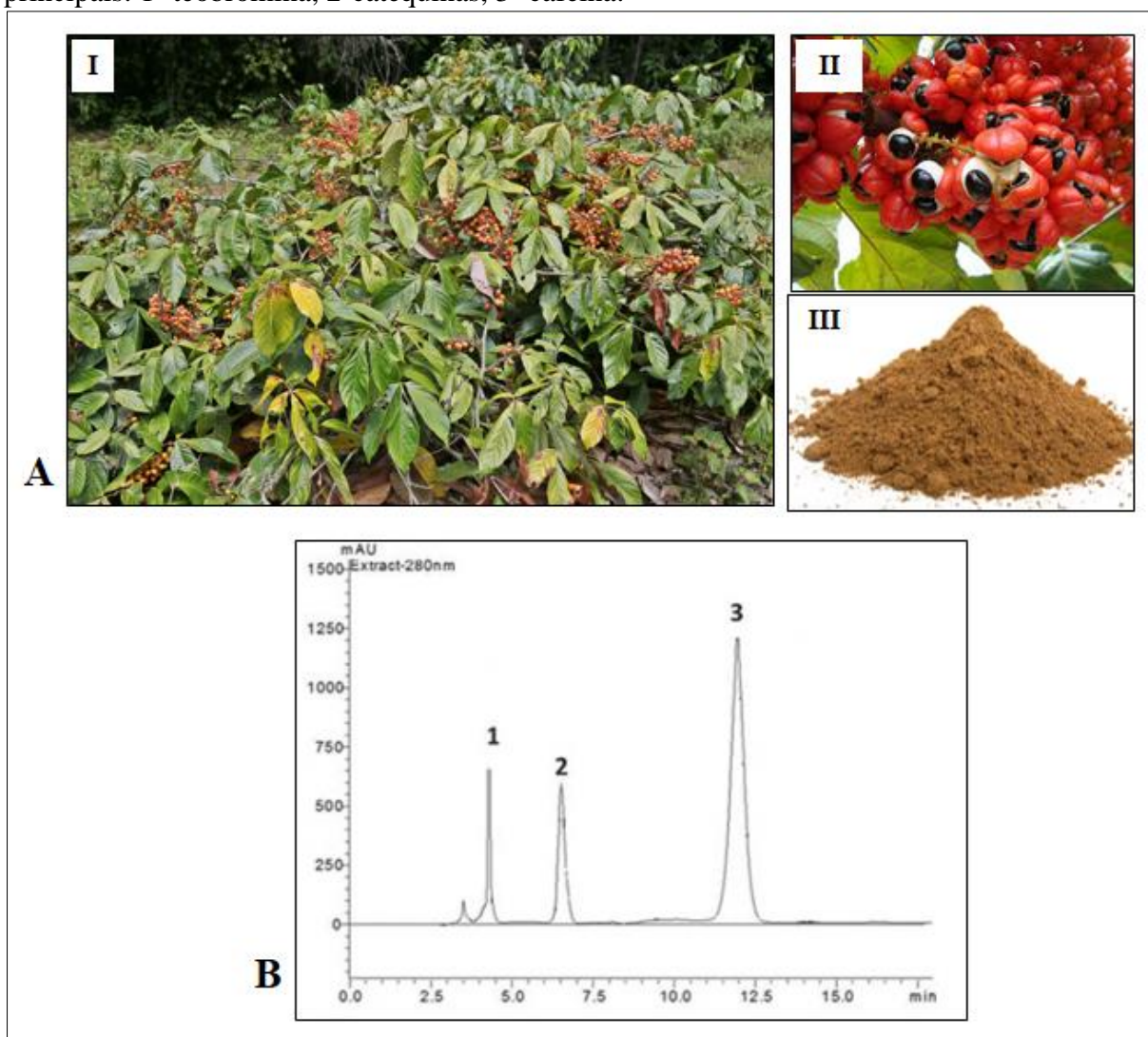
Ainda, há uma gama de compostos naturais com possível ação anti-inflamatória, e ricos em catequinas como o Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.), que demonstrou diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias e elevar IL-10, *in vivo* e *in vitro* (KREWER et al., 2014).

O Guaraná (Figura 16 A) é uma planta pertencente à família *Sapindaceae*, nativa da região Amazônica, comumente utilizado na medicina tradicional como estimulante/energético e afrodisíaco (KREWER et al., 2011).

Hoje há diversos estudos comprovando atividades biológicas benéficas do guaraná tais como: efeito antidepressivo a longo prazo (OTOBONE et al., 2005), antibacteriano e antifúngico (BASILE et al., 2005; YAMAGUCHI-SASAKI et al., 2007), energético (CAMPOS et al., 2011), atividade antioxidante (KREWER et al., 2011; MACHADO et al., 2015), antiobesogênico, hipolipídico e na modulação neuro-cognitiva (DALONSO e PETKOWICZ, 2012), redução dos níveis de LDL-oxidado e doenças cardiovasculares (PORTELA et al., 2013), retardo no envelhecimento celular (MACHADO et al., 2015), antitumoral (HERTZ et al., 2015; CADONÁ et al., 2015;2017), citoprotetor (KOBBER et al., 2016), e efeito anti-inflamatório (KREWER ET AL., 2014; SULEIMAN et al., 2016; RUSCHEL et al., 2017).

Atribui-se a constituição química do guaraná esta gama de propriedades farmacológicas. Hertz et al. (2015), analisaram a composição química do guaraná proveniente de Maués-Amazonas, via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e os compostos bioativos majoritariamente encontrados no guaraná foram cafeína = 12.240 mg/g, teobromina = 6.733 mg/g e catequinas= 4.336 mg/g (Figura 16B) Por serem os principais compostos do guaraná, dissertaremos mais sobre nos próximos tópicos.

Figura 16- Guaraná. A- Partes do Guaraná I-Planta do Guaraná, II- Sementes, III-Pó produzido a partir das sementes. B- Cromatografia do extrato hidro-alcoólico do Guaraná exibindo 3 picos principais: 1- teobromina, 2-catequinas, 3- cafeína.



Fonte: Figuras do Guaraná: Embrapa Amazônia Ocidental. Gráfico do Cromatógrafo Hertz et al., (2015) Montagem da figura: A autora desta Tese.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), é um metabólito secundário presente em mais de 60 plantas. É a substância com propriedades psicoativas mais consumida no mundo e comercialmente está presente em diversas bebidas e produtos comercializados, como café, chá, chocolate, cacau, refrigerantes e bebidas energéticas. Somente de café, a bebida cafeinada mais popular, são consumidas cerca de 1,6 bilhões de xícaras/dia (CAPELETTI et al., 2015). Nos Estados Unidos, entre 2009-2010 o consumo médio de cafeína *per capita* foi de 180 mg/dia (FULGONI et al. 2015).

Ainda de acordo com o mesmo autor, a cafeína apresenta uma série de efeitos farmacológicos tais como: antioxidante, diurética, estimulante do sistema nervoso central, ação anti-inflamatória, estudos relacionam a cafeína a prevenção do mal de Alzheimer e Parkinson.

A nível de sistema nervoso central, o mecanismo de ação baseia-se no antagonismo competitivo da cafeína aos receptores de adenosina A1 e A2A. A adenosina age nos diversos sistemas fisiológicos e os efeitos, geralmente, são opostos aos da cafeína. Assim, a maioria dos efeitos farmacológicos da cafeína parece depender da ação antagonista da adenosina nos receptores das superfícies celulares (RYUNG et al., 2015).

Os receptores A1 encontram-se, principalmente, nos terminais pré-sinápticos, onde inibem a liberação de vários neurotransmissores incluindo a dopamina e a serotonina (RYUNG et al., 2015). O antagonismo aos receptores de adenosina faz com que a liberação de noradrenalina não seja inibida, produzindo os efeitos da cafeína sobre o comportamento, percepção e processos de pensamento (HEDGES et al., 2009).

Na revisão de Ryung et al (2015), os autores sugerem que o consumo de cafeína pode estar relacionado ao desenvolvimento de transtornos de humor, por atuar como antagonista competitivo dos receptores de adenosina A1 e A2A e assim afetar a atividade da dopamina, esse poderia ser um mecanismo para explicar os efeitos da cafeína sobre o comportamento, a percepção e processos de pensamento. Ainda a cafeína pode afetar a liberação de norepinefrina e elevar os níveis desse neurotransmissor, induzindo sintomas de pânico ou ansiedade. Os mesmos autores sugerem avaliação cuidadosa em relação à possibilidade de consumo de cafeína por estes pacientes. Menkes (2011) relatou psicose transiente após o consumo de única dose de consumo de bebida energética contendo 600 mg de cafeína.

Há evidências relacionando o consumo de altas doses de cafeína com o desenvolvimento de transtornos mentais. Estudos demonstrando efeito pró-psicose da cafeína com doses entre 200 a 4.600mg de cafeína / dia. Entretanto, não há estudos que demonstrem efeito da cafeína com doses muito baixas (abaixo de 5 mg/dia) (RYUNG et al., 2015).

As catequinas como epicatequina e epigallocatequina fazem parte da classe dos flavonoides e são os constituintes monoméricos dos taninos condensados. Estudos epidemiológicos mostram que o consumo de alimentos derivados de plantas traz diversos benefícios à saúde. Esse efeito na saúde tem sido associado, com componentes fitoquímicos e em especial catequinas presentes em alimentos de origem vegetal (DIETRICH-MUSZALSKA et al., 2012).

A teobromina (3,7-dimetilxantina) juntamente com a cafeína e a teofilina, são as metilxantinas mais abundantes na natureza e fazem parte da família dos alcaloides (BAGGOTT et al., 2013).

A teobromina é encontrada principalmente no cacau e conseqüentemente muito consumida via chocolate escuro, que contém de 25-35 mg de cafeína e 200-300 mg de teobromina por 40

g de chocolate (BRUINSMA e TAREN, 1999) assim ambos os compostos estão presentes em concentrações suficientes para produzir efeitos psicoativos.

Farmacologicamente a teobromina é utilizada como vasodilatador, diurético, estimulante cardíaco e respiratório, também, pode ser útil na gestão da fadiga e hipotensão ortostática (BAGGOTT et al., 2013).

Quanto ao mecanismo farmacológico da teobromina, sua ação ocorre via inibição de receptores de adenosina A1 e A2 A, o mecanismo parece ser o mesmo da cafeína, entretanto a intensidade da inibição é menor, uma vez que a afinidade da teobromina por tais receptores é de 2 a 3 vezes menor que a cafeína (BAGGOTT et al., 2013).

Na comparação farmacocinética da cafeína com a teobromina, há uma diferença substancial. A cafeína é altamente solúvel em água, com pico no sangue em 30-40 minutos após a ingestão, a meia-vida é de 2,5-5 horas. Já a teobromina é solúvel em lipídios, e atinge o pico de concentração plasmática em 2-3 horas após a ingestão, a meia-vida é de 7 horas (BAGGOTT et al., 2013). A cafeína penetra a barreira sangue-cérebro mais rapidamente do que a teobromina (SVENNINGSSON et al., 1999). Teobromina, por outro lado, é um estimulante cardíaco mais potente que a cafeína e pode ser utilizada em seres humanos como um dilatador de artérias coronárias em doses diárias de 300 - 600 mg (MOFFAT, 1986). Estudo de Van Den Bogaard e colaboradores (2010) mostrou que a ingestão de 979 mg de teobromina, uma vez por dia durante 3 semanas, reduziu a pressão arterial sistólica e melhorou o desempenho cardíaco.

Geraets et al. (2006), observaram fortes efeitos inibidores da teobromina na atividade da enzima poli nuclear (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), que está implicada no metabolismo inflamatório e consequentemente em doenças inflamatórias agudas e crônicas, demonstrando potencial efeito anti-inflamatório desta xantina.

### **1.10.3 Fatores farmacológicos**

Apesar de ser um fármaco eficaz no controle dos sintomas dos TEBs evidências sugerem que o lítio pode interagir com outros fármacos. A interação Lítio e anti-inflamatórios não hormonais como o diclofenaco sódico ou potássico, indometacina, piroxicam, e com diuréticos é bem conhecida. Estes fármacos aumentam a reabsorção tubular de Lítio, elevando o nível plasmático, podendo ocasionar intoxicação (SILVA, 2010). Outro estudo também mostrou que o anti-inflamatório flurbuprofeno inibiu a excreção renal do lítio (UWAI et al., 2017).

É sabido que a janela terapêutica do lítio é estreita e a longo prazo, a ingestão do fármaco pode ocasionar efeitos tóxicos como distúrbios do coração, fígado, rim, testículos, e alterar

funções do sistema gastrointestinal (ARAL et al., 2008; BOCCHETTA et al., 2013). SAAD et al (2017), realizaram estudo demonstrando que ratos tratados concomitantemente com lítio e *Malva sylvestris*, quando comparados aos animais tratados apenas com lítio, maior peso de testículos e órgão sexual, maior contagem de espermatozoides e motilidade, e ainda maiores níveis séricos de testosterona. Ainda o grupo lítio apresentou maiores níveis de lipoperoxidação e queda na atividade das enzimas antioxidantes. O tratamento com malva foi capaz de proteger o coração contra danos.

Mohseni et al., (2017), investigaram o efeito sinérgico da agmatina (suplemento derivado da arginina) e lítio em ratos depressivos. Os resultados demonstraram que a agmatina aumenta o efeito antidepressivo do lítio no teste de natação forçada em ratos e esse efeito parece se dar através da via NMDA.

Foi realizado um ensaio clínico para avaliar o efeito da aspirina na disfunção sexual relacionada ao lítio em homens com transtorno afetivo bipolar estável, os pacientes foram tratados por 6 semanas com aspirina, além do lítio. Ao final do período experimental os pacientes melhoraram significativamente na disfunção sexual (SAROUKHANI et al., 2013).

Hammond e Vangu (2017), avaliaram o efeito das concentrações de lítio adjuvantes em concentrações séricas de tiroxina (T4) em pacientes tratados com iodo radioativo. O lítio foi capaz de melhorar a resposta dos pacientes a T4, permitindo inclusive a diminuição da dose sem prejuízo terapêutico, esses resultados foram observados em pacientes com bócio nodular e/ou hipotireoidismo.

Em relação a interação do lítio com fármacos antidepressivos, Birkenhäger et al, (2006) compararam a eficácia da imipramina e da fluvoxamina em pacientes deprimidos internados que posteriormente receberam suplemento de lítio, em caso de resposta antidepressiva não satisfatória, o estudo foi realizado com 138 pacientes e mostrou que o tratamento com imipramina com subsequente adição de lítio é superior a uma estratégia similar com fluvoxamina. Fonseca e colaboradores (2006), avaliaram a eficácia e segurança do escitalopram no tratamento da depressão bipolar, em 20 pacientes ambulatoriais. Durante 12 semanas, esse pacientes receberam escitalopram de forma adjuvante ao estabilizador de humor em curso. Os achados sugerem que o escitalopram em associação com estabilizadores de humor, como o lítio, podem ser uma forma eficaz e razoável para o tratamento de pacientes com depressão bipolar moderada a grave. Vale ressaltar que os resultados são semelhantes a estudos já publicados com ISRS.

Vê-se que os estudos são relativamente escassos e limitados a eficácia do controle dos sintomas do humor. Estudos sobre o efeito da interação lítio e psicofármacos antidepressivos,



analisando se a resposta inflamatória é modulada de maneira diferencial ainda não foram conduzidos.

### 1.11 HIPÓTESE DO ESTUDO

Considerando que a fisiopatologia de doenças psiquiátricas, como os TEBs, SCZ e depressão, não está totalmente esclarecida e que existem evidências sugerindo que a inflamação exerce um papel relevante tanto na evolução destas morbidades psiquiátricas quanto na resposta ao tratamento, o presente estudo está subsidiado na seguinte hipótese: O Litio é um modulador de humor que possui ação anti-inflamatória reconhecida via modulação da enzima GSK-3 $\beta$ . Entretanto, essa ação anti-inflamatória poderia ser influenciada por fatores: (1) genéticos, como é o caso do polimorfismo Val16Ala-SOD2; (2) fatores ambientais, como o consumo cotidiano de bebidas ricas em uma matriz nutricional de xantinas-catequina; (3) pela interação com fármacos antidepressivos, concomitantemente utilizados com o Litio na clínica psiquiátrica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* a influência de fatores genéticos, nutricionais e interação farmacológica com antidepressivos na resposta anti-inflamatória do lítio.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Avaliar *in vitro* o impacto do desbalanco genético Superoxido-Peróxido de Hidrogênio (Val16Ala-SOD2) na modulação do metabolismo oxidativo-inflamatório e indicadores de imunossenescência de CMSP expostas cronicamente a um agente pró-inflamatório e sua influência na ação anti-inflamatória do Litio via modulação da enzima a GSK-3 $\beta$ .

-Avaliar *in vitro* o efeito do tratamento simultâneo com lítio, xantinas e/ou catequinas em baixas doses na resposta inflamatória de macrófagos RAW 264.7;

-Avaliar a influência *in vitro* da exposição a antidepressivos (imipramina, nortriptilina, fluoxetina, escitalopram) na resposta anti-inflamatória e na modulação de marcadores oxidativos pelo associada ao lítio utilizando macrófagos RAW 264.7 como modelo experimental.

### 3 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL

Inicialmente seriam conduzidos três estudos a fim de responder aos objetivos específicos dessa tese. Entretanto, o primeiro objetivo, foi subdividido em 2 estudos realizados em diferentes tempos e organizados em 2 manuscritos complementares. Por esse motivo, o delineamento metodológico geral é apresentado considerando os artigos que compõe a presente tese.

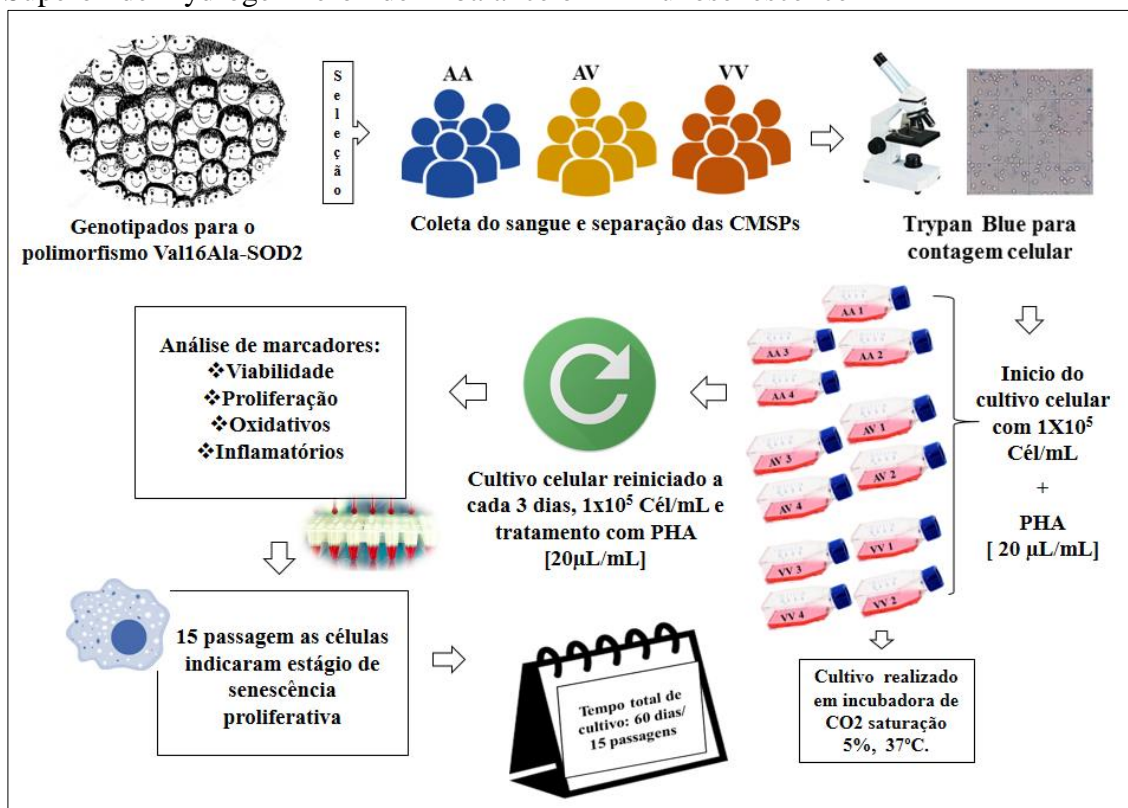
#### 3.1 DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 1:

Cujo o objetivo foi avaliar o impacto do desbalanco genético Superoxido-Peróxido de Hidrogênio (Val16Ala-SOD2) na modulação do metabolismo oxidativo-inflamatório e indicadores de imunossenescência de CMSP expostas cronicamente a um agente pró-inflamatório.

Inicialmente foram convidados a participar do estudo voluntários previamente cadastrados no banco de genotipados para o Polimorfismo Val16Ala-SOD2 do Laboratório Biogenômica, foram selecionados 4 indivíduos por genótipo, todos jovens saudáveis, não-fumantes, com estilo de vida semelhante, que não apresentavam quadros inflamatórios agudos ou crônicos, Os voluntários foram aconselhados a evitar comer / beber alimentos antioxidantes, como vegetais e frutas, durante as 24 horas que antecederam a coleta, bem como suplementos multivitamínicos para minimizar a influência da dieta.

Foram coletados 30 mLs de sangue, as CMSP foram separadas por gradiente de concentração utilizando-se Histopaque 1077, realizada a contagem celular via teste Trypan Blue. As CMSP de cada doador foram cultivadas em garrafas de cultivo celular, em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos e antifúngicos, em incubadora de CO<sub>2</sub> saturação de 5%. A cada 3 dias, o cultivo era reiniciado, totalizando 15 reinícios/passagens, todos ocorreram com  $1 \times 10^5$  Cél/mL e tratamento com fitohemaglutinina, um indutor de estímulo inflamatório. A cada reinício/passagem foi realizado o teste MTT para avaliação da proliferação celular, e realizados testes para marcadores oxidativos (óxido nítrico, superóxido, Produção de EROs via DCFH-DA, Lipoperoxidação via TBARS, Carbonilação de proteínas, e 8 deoxiguanosina), inflamatórios (níveis proteicos de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10), viabilidade e proliferação celular (MTT, Ciclo celular [marcação por iodeto de propídeo], Marcação por Iodeto de Propídeo e Anexina). O delineamento geral do artigo 1, está representado na Figura 17, abaixo.

Figura 17: Delineamento experimental geral do artigo 1: The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence



Fonte: A autora desta Tese.

### 3.2. DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 2

Com o objetivo de avaliar a influência do desbalanço Val16Ala-SOD2 genético e farmacologicamente induzido na ação anti-inflamatória do Lítio via modulação diferencial da enzima GSK-3 $\beta$ .

Para avaliar o impacto do desbalanço S-PH, na ação do lítio sobre a enzima GSK-3 $\beta$ , foram realizados dois protocolos. Um no qual o desbalanço S-HP tinha origem genética, isso foi possível através da coleta de sangue de voluntário previamente genotipados para cada um dos polimorfismos. E outro protocolo farmacológico no qual o S-HP, foi induzido em macrófagos da Linhagem RAW 264.7, a indução ocorreu através do tratamento com Paraquat (Um indutor de produção de S, mimetizando assim o genótipo VV) e porfirifina (uma SOD-like, mimetizando assim o genótipo AA e ocasionando aumento nos níveis de HP).

Inicialmente, foram coletadas apenas CMSP pertencentes ao genótipo AV, por esse ser considerado balanceado, foram tratadas com Lítio nas concentrações de 0.17-0.35-0.70- 1.40-2.80 mEq/L e após 24 horas realizada a análise da expressão gênica da GSK-3 $\beta$ , a partir dos

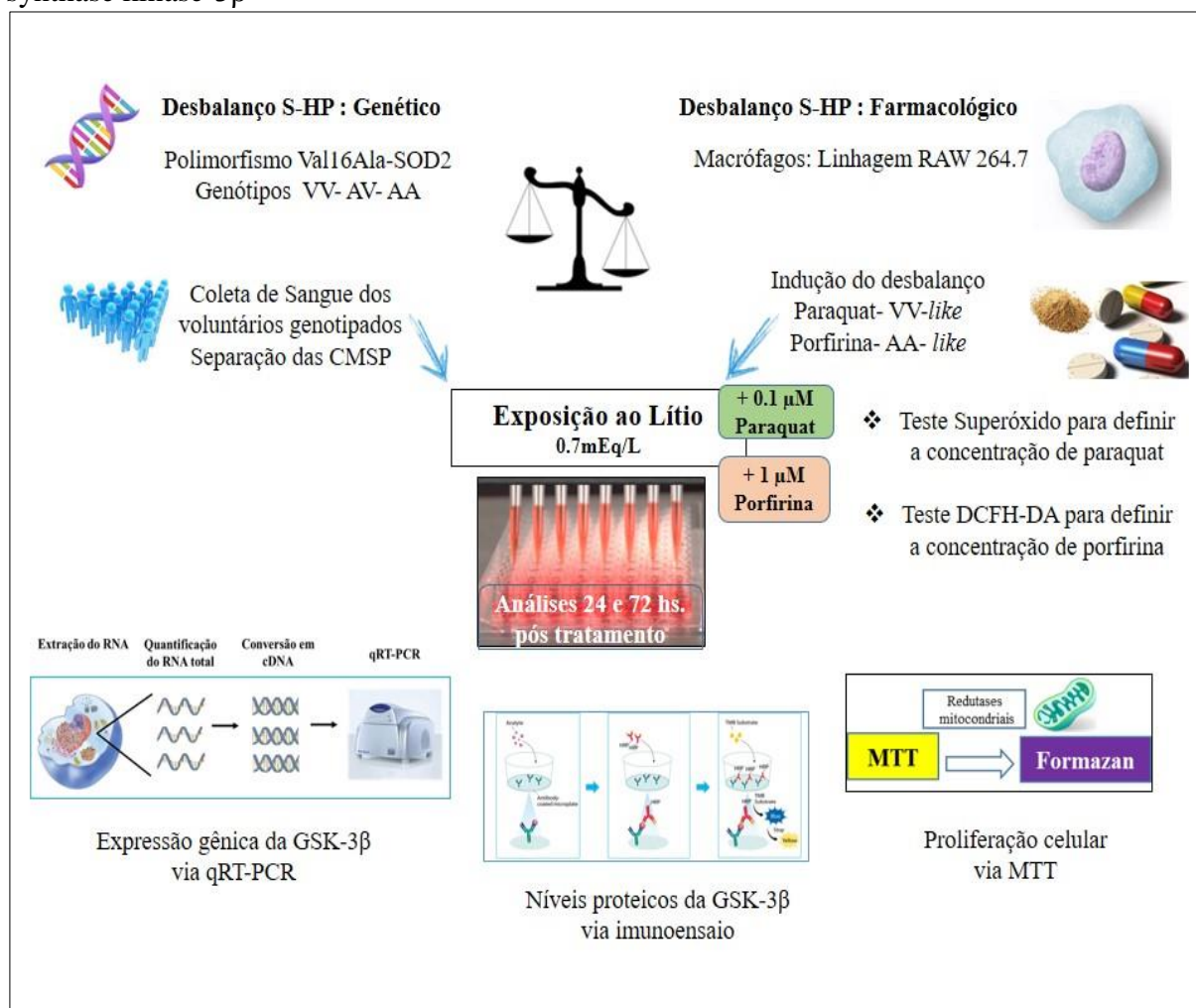
resultados estabeleceu-se que a concentração de 0,7 mEq/L, seria utilizada em todos os demais testes.

Para estabelecer a concentração de porfirina e paraquat a ser utilizada, realizou-se uma curva para cada um dos compostos. Quanto ao paraquat tratamos os macrófagos com as concentrações de 0.1-0.2-0,4-0.5-1 $\mu$ M e analisamos os níveis de S. Em relação a porfirina tratamos os macrófagos com as concentrações de 1,3,10,30 e 100  $\mu$ M e analisamos os níveis de ROS, incluindo PH. A concentração de escolha de ambas as moléculas foi a menor testada, sendo o paraquat 0.1  $\mu$ M e a porfirina foi 1  $\mu$ M.

Um vez que o lítio é considerado uma molécula anti-inflamatória, em ambos os protocolos as células foram expostas a PHA (125 $\mu$ g/mL), um indutor de inflamação.

Nos dois modelos, a expressão do gene GSK-3 $\beta$  e o nível da proteína foram determinados após 24 horas de exposição. A proliferação celular analisada através do teste MTT (72 horas), foi utilizado como uma confirmação diferencial dos resultados. Um resumo esquemático dos procedimentos experimentais adotados pode ser observado na figura 18 (abaixo).

Figura 18: Delineamento experimental geral do artigo2 : Genetic and Pharmacological Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance modulate in vitro Lithium effects on Glycogen synthase kinase-3 $\beta$



Fonte: A autora desta Tese

### 3.3 DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 3

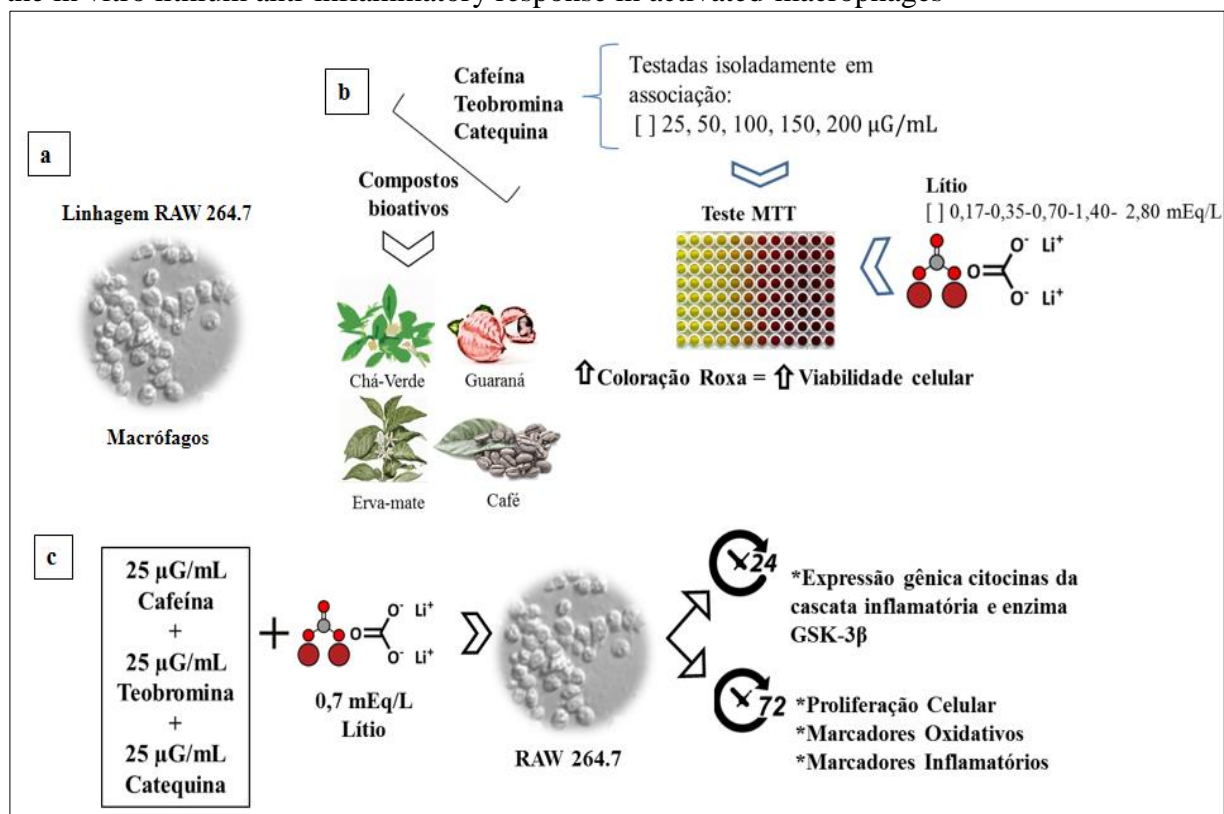
Cujo o objetivo, foi avaliar *in vitro* o efeito simultâneo do tratamento com lítio e xantinas e/ou catequinas em baixas doses na resposta inflamatória de macrófagos RAW 264.7.

O estudo *in vitro* foi realizado utilizando macrófagos comerciais da linhagem RAW 264.7 (Figura 19a), produzidos pela American Type Culture Collection (ATCC-Manassas-USA), e congelados no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em incubadora de CO<sub>2</sub> saturação de 5%, em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de antibiótico e 1% de antifúngicos, em condições estéreis. Inicialmente foi realizada um curva de concentrações com Lítio e com as moléculas bioativas para se definir quais concentrações seriam utilizadas no decorrer do trabalho, a partir da análise da proliferação celular, via teste MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).

Schatzberg e Nemeroff (2009), postularam que a concentração terapêutica do lítio é 0,7mEq/L, assim foram testadas concentrações superiores 1,4 e 3,5 mEq/L e inferiores 0,35 e 0,17 mEq/L. Em relação a cafeína, teobromina e catequina isoladamente e em associação (mix) foram testadas as concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200  $\mu$ G/mL de cada uma das moléculas (Figura 19b). A fitohemaglutinina, foi utilizada como Controle pró-inflamatório.

A partir dos resultados optou-se por utilizar a concentração de 0,7mEq/L de lítio e uma mistura (mix) das 3 moléculas bioativas cada uma na concentração de 25  $\mu$ G/mL. Foram então realizados novos tratamentos, somente com as concentrações de escolha, e foram realizadas as análises após 72 horas de incubação dos tratamentos: proliferação via ciclo celular com marcação por iodeto de Propídeo, marcadores oxidativos ( Níveis de superóxido, óxido nítrico, Lipoperoxidação, carbonilação de proteínas, EROS via DCFH-DA, e atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX), citocinas da cascata inflamatória ( IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10), a análise da expressão gênica das citocinas já citadas e da GSK-3 $\beta$  foi realizada após 24 horas de incubação (Figura 19c).

Figura 19: Delineamento experimental geral do artigo 3- A xanthine-catechin mix intensifies the in vitro lithium anti-inflammatory response in activated-macrophages



Fonte: A autora desta Tese.

### 3.4 DELINEAMENTO GERAL ARTIGO 4:

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito sinérgico do tratamento com antidepressivos (Imipramina, Nortriptilina, Fluoxetina, Escitalopram) e lítio na modulação de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo de macrófagos RAW 264.7.

Para analisar o efeito da interação do lítio com antidepressivos: Imipramina, Nortriptilina, Fluoxetina e Escitalopram, foram utilizadas células da linhagem RAW 264.7 seguindo os mesmos padrões de cultivo já descritos no artigo 3. Primeiramente foi realizada uma curva concentração-resposta, baseada em Schatzberg e Nemeroff, 2009, construída a partir de duas concentrações inferiores e duas superiores a à dose terapêutica de cada fármaco: Lítio = 0,17, 0,35, **0,7**, 1,4 e 2,8 mEq /; Imipramina = 50, 100, **200**, 400 e 800 ng / mL; Nortriptilina= 25, 10, **100**, 200 a nd 400 ng / L; Fluoxetina = 50, 100, **200**, 400 e 800 ng / mL; Escitalopram = 12,5, 25, **50**, 100 e 200 µG / L). A Fitohemaglutinina foi utilizada como controle positivo, indutor de resposta inflamatória de macrófagos, a concentração utilizada foi 40 µg / mL. A partir da curva, foi estabelecido como concentração de escolha, as doses terapêuticas de cada um



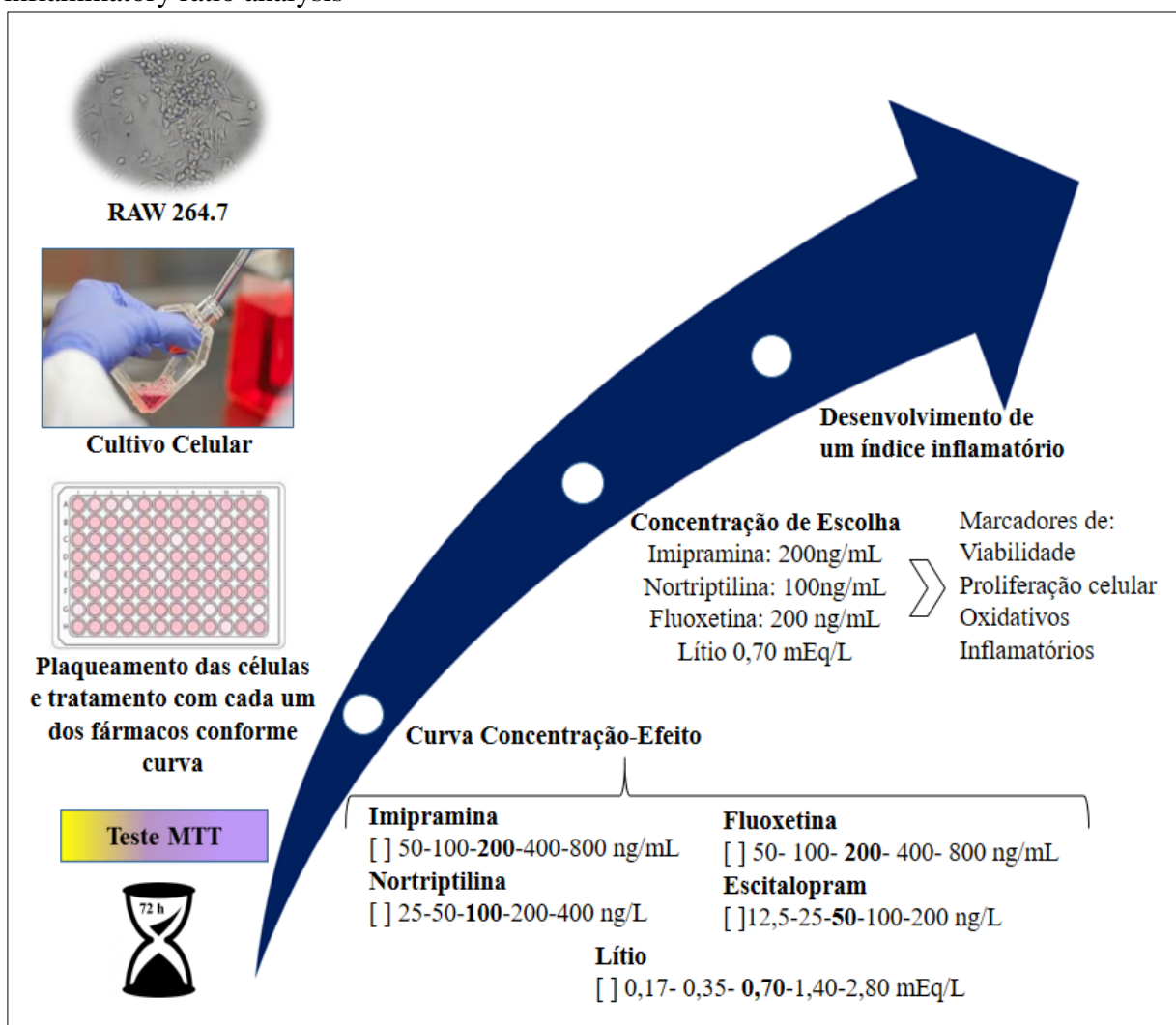
dos fármacos, ou seja Lítio 0,7 mEq/L, Imipramina 200ng/mL, Nortriptilina 100ng/L, Fluoxetina 200 ng/mL e Escitalopram 100 µG/L.

As células foram então tratadas com cada uma das concentrações de antidepressivos em associação com o Lítio, e foram analisados marcadores de viabilidade, proliferação celular, oxidativos e inflamatórios. Foi ainda desenvolvida um índice inflamatório (IF) em que:

$$\text{IF} = \frac{\% \text{ do controle de marcadores pró-inflamatórios}}{\% \text{ do controle da IL10X}} \\ (\text{n}^{\circ} \text{ de marcadores inflamatórios adicionados acima})$$

Considerando os erros padrão relacionados a alguma variação nas condições experimentais, os tratamentos com valores abaixo de 1 ( $> 0,8$ ) foram considerados com efeito anti-inflamatório, enquanto os tratamentos com valores  $> 1,2$  foram considerados como pró-inflamatórios. Os valores entre 0,81 e 1,19 foram considerados semelhantes às células não tratadas. Para confirmar a associação entre o estado inflamatório e os valores de IF, realizamos uma análise de marcadores de 154 indivíduos que participaram do estudo Duarte et al (2010), abaixo delineamento geral artigo 4.

Figura 20: Delineamento experimental geral do artigo 4: Lithium anti-inflammatory effects is differentially modulated by interaction with antidepressant drugs determined by an inflammatory ratio analysis



Fonte: A autora desta Tese.

## 4 RESULTADOS

Os resultados estão descritos sob a forma de 4 artigos científicos:

- Artigo 1, publicado na Revista *Rejuvenation Research*, fator de impacto 3,66.
- Artigo 2, a ser submetido a Revista *Gene*, fator de impacto 2, 26.
- Artigo 3, submetido a Revista *BioMed Research International*, fator de impacto 2,47.
- Artigo 4, submetido a Revista submetido a Revista *Plos One*, fator de impacto 3,54.

### 4.1 ARTIGO 1

#### **The *in vitro* influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence**

Abbreviated title: Immunosenescence and oxidative imbalance

Fernanda Barbisan<sup>1,2</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>1</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>2</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>3</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup> Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

<sup>3</sup> Center of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Canoas-RS, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

\*Corresponding author

Address for correspondence and reprints: Ivana Beatrice Mânica da Cruz, MSc, PhD, Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Avenue Roraima 1000, Building 19, Chamber 3102, Santa Maria, RS, Brazil, Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-91199099; Fax: 55-55-32208239; Email: ivana.ufsm@gmail.com

Word count: 5,421

Keywords: SOD2, MnSOD, gene polymorphism, oxidative stress, inflammation

## Abstract

As superoxide is a key molecule of inflammatory activation, superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance genetically caused could to alter immunosenescence patterns. To test this hypothesis, we collected and cultured peripheral blood mononuclear cells carrier's different genotypes of a genetic polymorphism located in the superoxide dismutase manganese dependent gene (Val16Ala-SOD2). We used an in vitro genetic model based on previous studies, which suggested an association between homozygous genotypes (AA and VV) and alterations in oxidative- inflammatory mediators. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) collected from young healthy volunteers were cultured in the presence of phytohemagglutinin, as well as the follow cell culture passages obtained from the 72-hour initial culture. Each follow passage started with the same cell concentration ( $1 \times 10^5$  cells). The general immunosenescence pattern was observed independently of SOD2 genotypes: cellular proliferation until the 15th passage, when cellular arrestment occurred in the G0/G1 phase. From the 10th passage a higher proliferative state was observed indicating inflammatory hyperactivation, with an increase in the levels of inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), nitric oxide, superoxide, lipoperoxidation, protein carbonylation, reactive oxygen species and DNA damage. The S-HP imbalance affected the intensity of some immunosenescence parameters. AA cells, which present basal high HP levels, were associated with higher DNA damage and lipoperoxidation levels, whereas VV, which present basal high S levels, was associated with higher proinflammatory cytokine levels. In summary, the results suggested that a basal S-HP imbalance could affect the intensity of some immunosenescence markers, and this influence could explain the potential association between an imbalance of genotypes (AA and VV) and the risk of developing some chronic diseases

## Introduction

The immune system presents an age-associated deterioration state referred to as "immunosenescence", which triggers functionality and responsiveness problems. With regard to the innate system, evidence has shown that aged macrophages can be activated without the presence of hosts or injuries, causing a subclinical chronic inflammatory process. The establishment of a chronic proinflammatory status associated with aged macrophages is known as "inflamm-aging" [1], and this process is characterized by a high production of M1-activated macrophages of proinflammatory mediators such as interleukin (IL)-1, IL-6 and TNF $\alpha$  [2].

Moreover, aging causes functional deficits in the T- and B-lymphocyte functions [3,4]. Therefore, these changes lead to the immune system becoming more inclined to elicit nonspecific inflammation, which accelerates degenerative morbidities such as cardiovascular and neurodegenerative diseases [5]. Some reactive molecules, such as nitric oxide (NO) and superoxide (S), which have an important to trigger phagocytic processes, can be decreased in aged macrophages [6].

Therefore, alterations in the oxidative metabolism has been associated with immunosenescence. In this process, impairment of the antioxidant system, which controls the levels of oxidative molecules, can also occur. This is the case with superoxide dismutase manganese-dependent (SOD2 or MnSOD), which dismutates S in hydrogen peroxide (HP) into mitochondria. Investigations have reported decreases in the levels of SOD2 in aged macrophages [7]. Previous studies suggested that an S-HP imbalance caused by a single nucleotide polymorphism (SNP) found in the SOD2 gene could alter or change cellular oxidative and inflammatory patterns. In this SNP, a change of valine (GTT) to alanine (GCT) on 16 codon causes a structural protein modification that affects the SOD2 transport into mitochondria and, consequently, the enzyme efficiency.<sup>8</sup> The SOD2 enzyme produced from A allele has an alpha-helix conformation and presents around a 40% more efficient SOD2 than V allele, which presents a beta-sheet protein conformation [9,10].

The association between Val16Ala-SOD2 and diseases associated with a chronic inflammatory grade seems to be bidirectional, generally associated with homozygous genotypes that cause both the highest (AA) and lowest (VV) SOD2 efficiency [11]. While the AA genotype has been associated with immunosenescence markers [11] and some cancer types and the worst infection response causing septic shock [12], the VV genotype has been associated with cardiovascular dysfunctions [13,14], metabolic morbidities such as hypercholesterolemia, obesity and diabetes complications [15,16,17,18,19], recurrent tonsillitis [20] and bronchial asthma [21]. Additional investigations also described that VV cells present higher proinflammatory cytokine levels than AV and AA cells [22]. These cells also have a differential response in the inflammatory cytokine levels when exposed to drugs and bioactive molecules, such as methotrexate [23], rosuvastatin [24] and resveratrol [25].

Therefore, it is plausible to infer that basal S-HP imbalance Val16Ala-SOD2 SNP associated could have some influence on immunosenescence. Given that it is difficult to investigate this hypothesis in vivo, we evaluated the SOD2 polymorphism influence on immunosenescence indicators of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) chronically in vitro activated by phytohemagglutinin (PHA) exposure.

## Methods

### General experimental design

The investigation analyzed the influence of a basal S-HP imbalance associated with Val16Ala-SOD2 on PHA (125 µg/ml). This antigen found in plants has carbohydrate-binding specificity, and T cell proliferation induced by PHA requires the presence of monocytes [26]. The following immunosenescence indicators were assessed here: cellular proliferative rate; apoptosis induction; modulation of NO, superoxide and cytokine levels (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  and IL-10); modulation of oxidative stress biomarkers (lipoperoxidation, protein carbonylation, reactive oxygen species and DNA damage).

PBMCs were initially cultured for 72 hours, and the cells obtained were considered 0 passage. These cultures were initially compared among PBMCs carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes, and used to obtain aliquots of cells to produce the next culture using the same cellular concentration used in the zero culture ( $1 \times 10^5$  cells), which was again PHA-exposed. Every 72 hours this procedure was repeated until the culture presented a consistent number of immunosenescent markers. Cellular proliferative response to PHA exposure was evaluated in all culture passages, whereas the other markers were sporadically analyzed. In the present study, PHA was chosen as the PBMC mitogenic activator since, in contrast to lipopolysaccharide (LPS), which is a major outer surface membrane component of gram-negative bacteria, PHA (lectin) is found in several types of foods habitually consumed by human beings including peas, peanuts, soybeans, dry beans, broad beans, dry peas, lentils and others [27]. Therefore, we considered the use of antigen to be more realistic, as PHA did not trigger acute inflammatory response associated with bacteria infection, which is the case with the LPS molecule.

### Ethics issues, Val16Ala-SOD2 genotyping and blood sample collection

This study is part of a research project previously approved by the Ethics Committee at the Universidade Federal de Santa Maria, Brazil, and all volunteers signed consent terms and agree to donate blood samples to perform in vitro assays (process number: 0332.0243.000-11). To obtain cells with different Val16Ala-SOD2 genotypes, three subject's carriers different genotypes (n total = 12) were chosen from a databank of 120 genotyped healthy volunteers that was established in a previous study conducted by Barbisan et al [23]. The genotyping was performed using a Phusion High-Fidelity PCR kit (Thermo Scientific CO, USA) to access

genomic DNA, and the genotype frequencies found in the samples were AA, 26.7%; VV, 28.2%; and AV, 45.1% and were in Hardy-Weinberg equilibrium. The blood samples were obtained from nonsmokers and nonobese subjects with similar health, anthropometric and lifestyle conditions including no previous history of any chronic degenerative disease or dysfunction, and that not intake daily medicine. At the moment of blood collection, we certified that the volunteers did not present any acute inflammatory conditions, such as infectious diseases. The volunteers were advised to avoid eating/drinking antioxidant foods such as vegetables and fruits for 24 hours as well as multivitamin supplements to minimize dietary influence on PBMCs. Each volunteer donated 30 ml blood samples, in order to obtain cell cultures in triplicate.

#### General cell culture protocol

All reagents and flasks used in the culture were acquired from Vitrocell, Waldkirch (St. Gallen, GE) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). To perform the PBMC cultures the blood samples of 12 subjects (four for each genotype) were collected by venipuncture in heparin tubes (Labttest, SP, Brazil). PBMCs were obtained within 1 hour of collection using Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) density gradient medium centrifuged for 15 minutes at 2500 rpm. The cells were counted in a Neubauer chamber using Trypan exclusion dye and  $1 \times 10^5$  PBMCs were cultured in RPMI 1640 culture medium with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 hours. Cultures were also supplemented with PHA (20 µL/mL) (Vibrocell, Waldkirch, St. Gallen, GE) in order to activate PBMCs (macrophages and T-lymphocytes). The cell populations obtained from blood samples were identified by flow cytometry analysis, taking into consideration the cell size and granulometry. A new culture passage was produced by centrifugation (20 min x 2000 rpm), discard of supernatant, cell resuspension, counting and transference by new flask cultures in the same mean culture conditions.

#### Cell proliferation and viability assays

The biochemical reagents for performing the spectrophotometry and microscopy assays were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Kits and reagents for performing flow cytometry were obtained from BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA). The rate of cell proliferation was evaluated by two assays. The Trypan blue dye exclusion assay was determined

by cell microscopic evaluation and by colorimetric MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. The MTT assay quantifies the level of NAD(P)-H-dependent cellular oxidoreductase enzymes, which reflects the number of viable cells. Absorbance was measured at 570 nm. Data were used to compare the proliferative response among cells carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes during each cell culture passage.

To confirm the proliferative response of PBMCs to PHA exposure, the frequency of cells in different cell cycle phases was determined (G0/G1, S and G2/mitosis phases) by flow cytometry [28]. Cell cycle analysis was similar to that described in Azzolin et al [29]. Briefly, the PI reagent binds to the DNA by intercalating between the bases with little or no sequence preference. PI also binds to RNA, necessitating treatment with nucleases to distinguish between RNA and DNA staining. Following incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS and resuspended in 70% ethanol. Further, cells were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight. Prior to conducting analyses, the cells were centrifuged and washed once with PBS, before being resuspended in 500  $\mu\text{L}$  propidium iodide (PI) solution in PBS: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI from 50 x stock solution (2.5 mg/mL) 0.1 mg/mL RNase A 0.05% Triton X-100 and incubated for 40 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Finally, 1 mL of PBS was added for washing and was resuspended in 500  $\mu\text{L}$  PBS for flow cytometry analysis.

Since the different cell culture passages could trigger apoptosis, this event was analyzed by flow cytometry using an Annexin-V-FITC and PI staining kit (BD Pharmingen™). Annexin-V-FITC can identify an early apoptotic process, whereas PI enables late or necrotic apoptotic cells to be identified. The apoptosis detection is determined through the bond the cell receptors form with the fluorescent antibodies Annexin-V and PI. The assay was performed following the manufacturer's instructions.

### Quantification of oxidative markers

Six oxidative markers were quantified in different cell culture passages: NO levels were determined spectrophotometrically by modified Griess method [30] and S levels [31]. Both assays were read at 550 nm. The Levine method [32] read at 370 nm was used to quantify protein carbonylation levels. Lipoperoxidation was estimated by the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) measured by spectrophotometry and read at 532 nm [33]. ROS level was quantified by dichlorofluorescein acetate fluorimetric assay (DCFDA) read at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. [34] DNA damage was determined by 8-deoxiguanosine (8-OHdG) using an ELISA immunoassay kit obtained from Abcam



(Cambridge, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. All levels of these variables were corrected by mg/protein.

#### Quantification of cytokines

Cytokines levels were quantified using kit immune assays from a Quantikine Elisa kit obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), which is able to quantify cytokines in cell culture supernates. The assays were performed according to the manufacturer's instructions. The sensitivity and detection range of each cytokine were respectively: IL-1 (1 pg/mL, 3.1–300 pg/mL); IL-6 (0.7 pg/mL, 3.1–300 pg/mL); TNF $\alpha$  (5.5 pg/mL, 15.6–1,000 pg/mL) and IL-10 (3.9 pg/mL, 7.8–500 pg/mL).

#### Statistical analysis

All measurements of variables analyzed in the study were performed in triplicate. As variance of results could be produced from individual variation or experimental errors, all evaluations were performed using an aliquot sample obtained from cultures from each volunteer with a similar SOD2 genotype. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). One-way analysis of variance or repeated-measures analysis of variance followed by Tukey's post hoc test were used to perform univariate analysis without considering Val16Ala-SOD2 polymorphism. The effect of this polymorphism on immunosenescence patterns was determined by two-way analysis of variance followed by post hoc Bonferroni test. The statistical tests were performed using GraphPad Prism software, and significant differences were considered when  $p < 0.05$ .

### Results

Flow cytometry analysis confirmed that cell cultures produced from PBMCs samples carrier's different Val16Ala-SOD2 genotype consisted of two mononuclear cell populations: macrophages (P8), and lymphocytes (P5) with the presence of a few lymphocyte precursors (P0) in very low concentrations (Figure 1A). As expected, exposure to PHA antigen caused immune activation observed by an increase in cellular proliferation in 72-hour cell culture (zero passage). A significantly higher cell proliferation was observed in AA than in V cell carriers

(VV and AV) (Figure 1B), indicating that the highly efficient SOD2 enzyme found in AA cells interferes with the speed and intensity of inflammatory response.

A cell proliferation pattern among different culture passages was initially evaluated without considering the Val16Ala-SOD2 genotype (Figure 1C). The results showed a similar proliferative rate from zero to the third passage. In culture passages 4–6 the proliferation rate increased substantially in comparison with initial cultures.

However, a nonexpecting cellular proliferative hyperactivation was observed from the 7th cell culture passage. However, between the 10th and 15th passage the cell concentrations tend to stabilize despite the cellular concentration being more than 10 times higher than the initial culture passages.

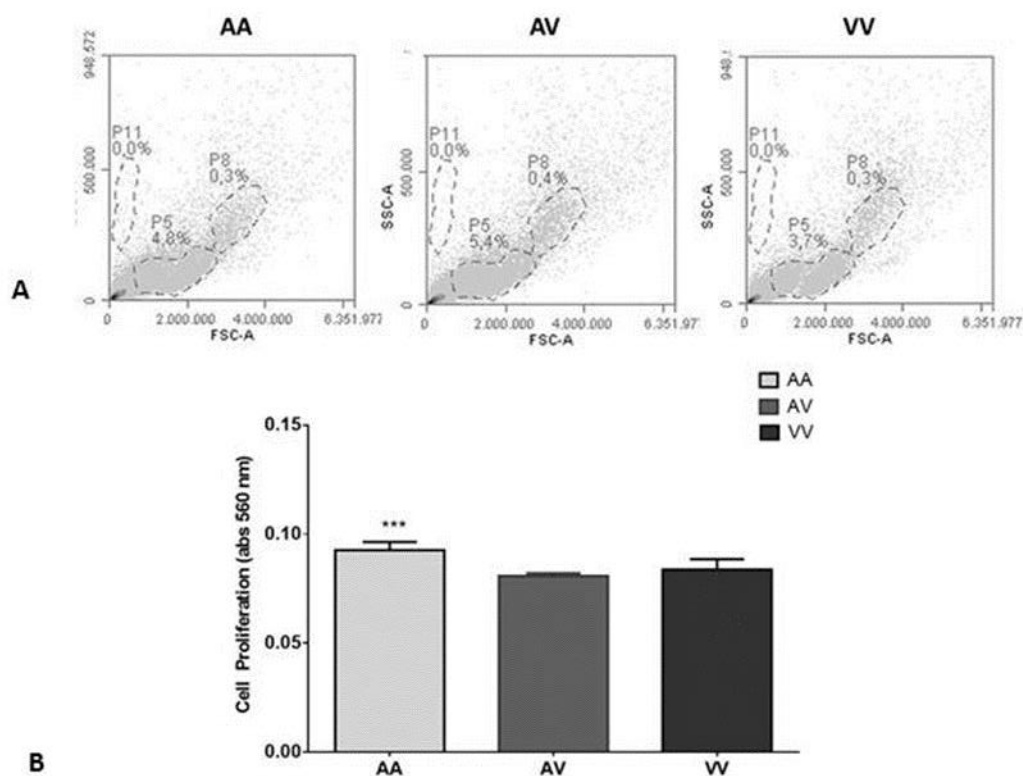
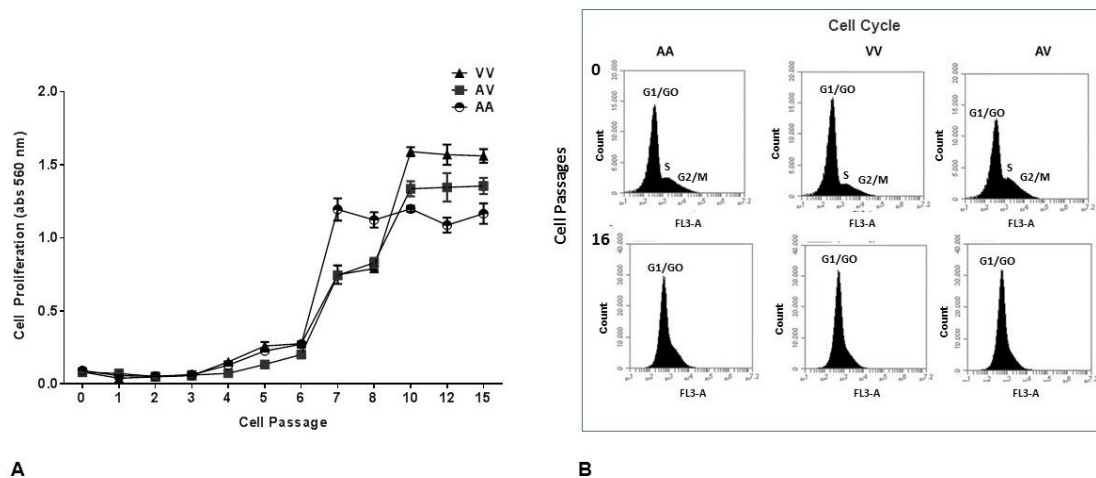


Figure 1 General characteristics of cell cultures produced from healthy adult subjects carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes, which causes basal superoxide- hydrogen peroxide (S-HP) imbalance. (A) identification of population cells obtained from isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carriers different SOD2 genotypes (AA, VV and AV). P5 = lymphocytes T; P8= macrophages; P11= lymphocyte precursors; (B) Comparison among initial cell culture activated with phytohemaglutin (PHA) obtained from PBMCs carrier's different SOD2 genotypes by One-way analysis of variance followed by *post hoc* Tukey test. Different letters (a, b, c) were used to identify statistical differences ( $p < 0.05$ ) among different cellular passages of each cell culture genotypes.

These results were compared among cells carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes (Figure 2A). Similar proliferative patterns found in zero cell cultures were observed until the 4th passage. However, in the 5th–6th cell culture passages, this pattern changed with a clear increase in cellular proliferation occurring. At this moment, cellular proliferative rates were higher in homozygous (AA and VV) than in heterozygous (AV) cells ( $p=0.001$ ).

The hyperactivation process was observed in all cultures, but again, AA cells presented a higher proliferative rate than V allele cells. However, in the next passage AA cells tended to maintain a similar proliferative pattern until the 15th passage, whereas VV and AV cells continued growing until the 10th passage. From this passage, V cells also showed a stabilization in cell proliferation rate until the 15<sup>th</sup> passage.

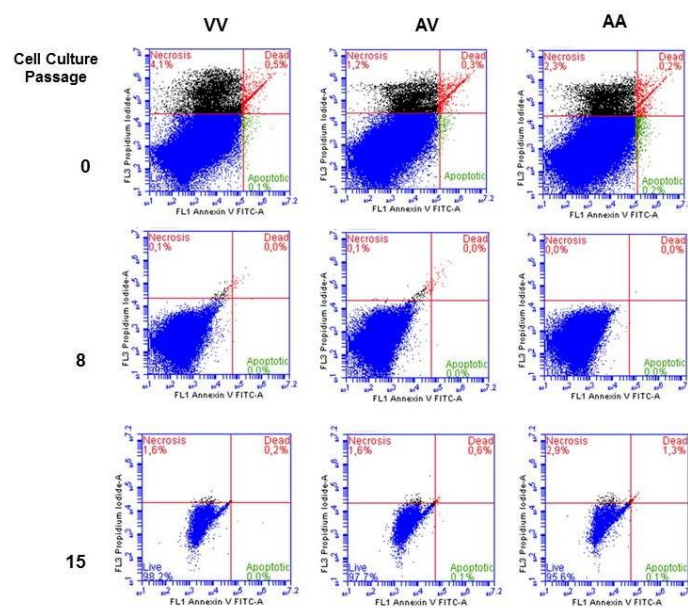
It is important to point out, which from 10th to 15th culture passages was observed production of synergic lymphocyte-macrophage clusters (rosettes) (Figure 2B) become difficult to continue the experiments. As cell cycle analysis by flow cytometry showed that most cells were in the G0/G1 phase indicating some proliferative senescence state, we opted to finish the analysis in the 15th cell culture passage. All cells presented a similar pattern independently of Val16Ala-SOD2 (Figure 2C).



**Figure 2** Comparison of some immunosenescence indicators of cell cultures produced from PBMCs carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes (AA, VV and AV). (A) Cellular proliferative rate determined by MTT assay and observed in different cell culture passages compared by two-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test. 0 passage was considered the initial cell culture obtained after 72 h, and 15th passage was considered the last cell culture analysed. (B) representative cell cycle graphics obtained from flow cytometry analysis that show change in the frequencies of G0/G1, S and G2/mitosis phases between 0 and 15th passages. Pattern changes in cell cycle were similar among cells carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes.

During the different cell culture passages analyzed here, apoptosis events were not

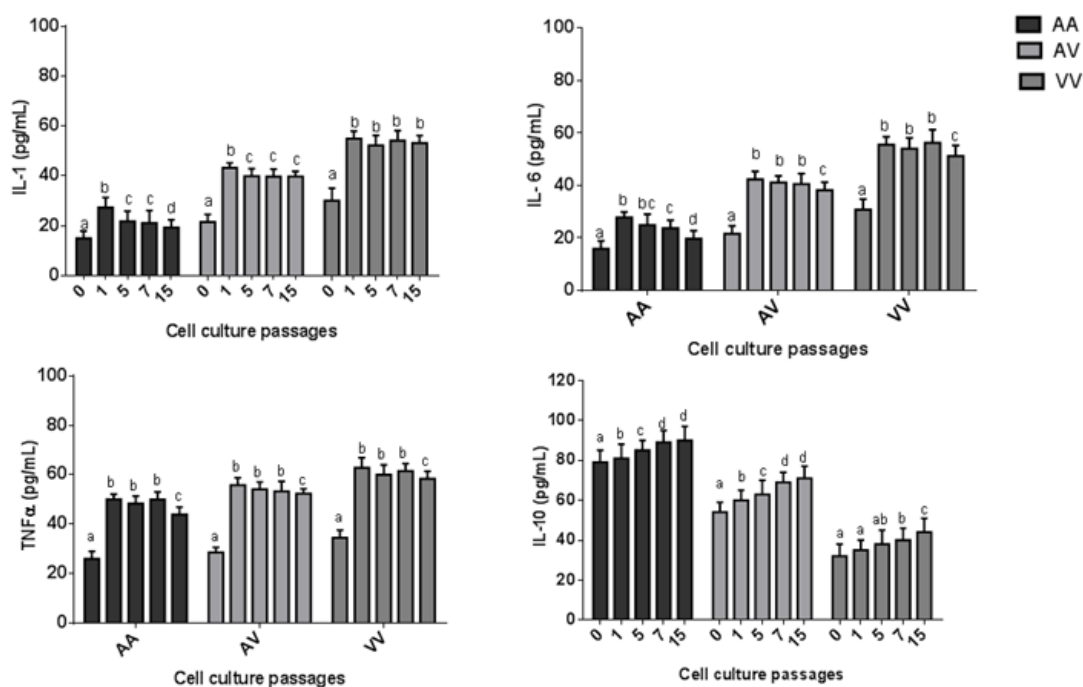
significant. In fact, as can be seen in Figure 3, necrotic and apoptotic events were higher in the initial culture (zero) than in subsequent cell culture passages, probably due to cell manipulation at the moment of collection and processing of blood samples. Although apoptosis events cannot be found in the cultures, the results showed a modification in the cell size and granularity in the last passage evaluated here when compared with initial cultures. These results were also observed in all samples indicating no influence of basal S-HP imbalance associated with Val16Ala- SOD2 SNP.



**Figure 3** Representative Annexin-V-FITC/PI flow cytometry of apoptosis events in different cell culture passages (0, 8 and 15th) of PBMCs carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes (AA, VV and AV). Apoptosis events were more frequent in initial culture (0 passage), and changes in cell morphology determined by size and granulometry were observed in 15<sup>th</sup> cultures. These results were independent of Val16Ala-SOD2 genotypes.

Inflammatory activation by PHA exposure among different cell culture passages was also analyzed by modulation of NO and superoxide and cytokine (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10) levels. NO concentrations were significantly lower in AV than in AA and VV cells in the zero passage ( $p < 0.001$ ). From the first to the 10th passage a slight increase in the levels of this oxidative marker was observed. Between the 10th and 15th passage a significant increase in NO concentrations occurred ( $p < 0.001$ ). These results were independent of Val16Ala-SOD2 SNP. S concentrations tended to increase linearly in relation to cell culture passages. From the first cell culture passage, the levels of all proinflammatory cytokines were significantly increased and continuously rose until the 15th passage. The only difference was that VV cells presented higher levels, AV- intermediary levels and AA lower levels of proinflammatory cytokines. The

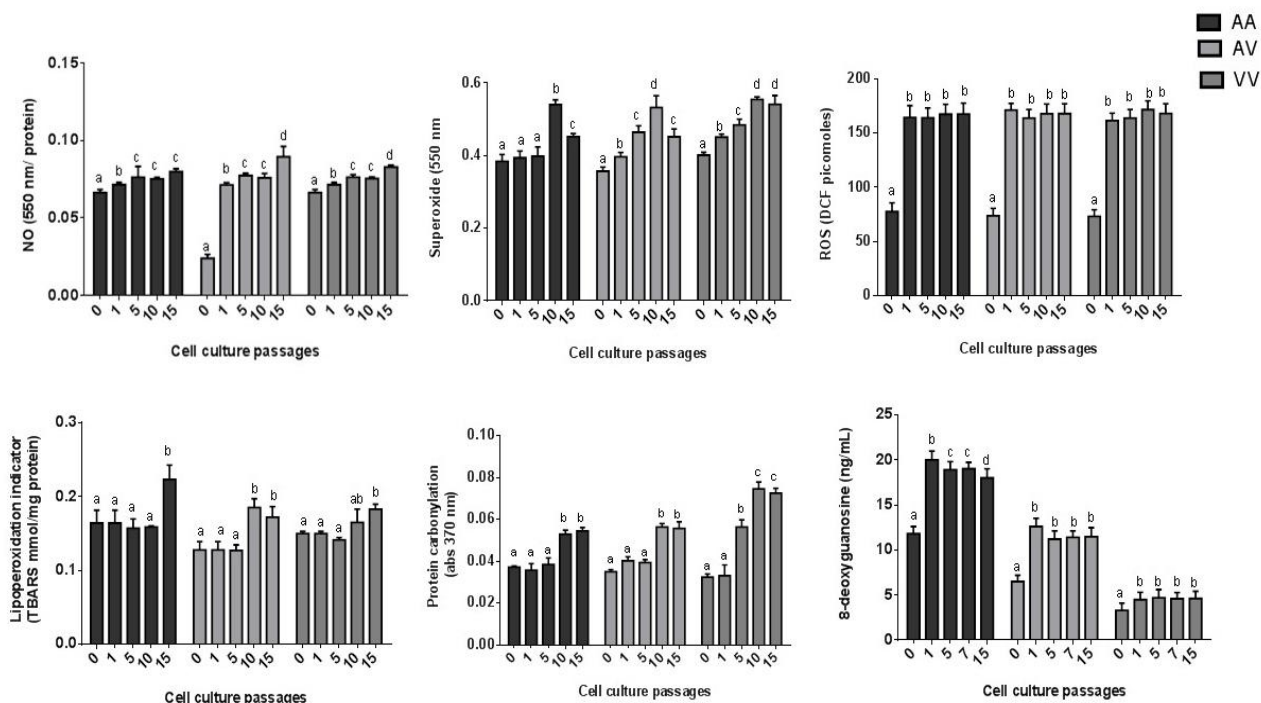
concentration of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, increased slightly among successive cell culture passages in all cells. However, higher IL-10 levels were observed in AA cells, whereas VV cells presented lower levels of this anti-inflammatory molecule. Again, AV cells presented intermediary levels in relation to homozygous cells.



**Figure 4** Comparison of inflammatory indicators among cell culture passages obtained from PBMCs carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes. IL-1 = interleukin 1; IL-6 = interleukin 6; TNF $\alpha$  = tumor necrosis factor alpha; IL-10 = interleukin 10. All variables were corrected by mg/ protein. Statistical comparisons were performed by two-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test and are commented in the text. Different letters (a, b, c) were used to identify statistical differences ( $p < 0.05$ ) among different cellular passages of each cell culture genotypes

Oxidative markers related to inflammatory response and oxidative stress were evaluated among cell culture passages obtained from PBMCs carrier's different SOD2 genotypes (Figure 5). From the first culture passage, the ROS levels were increased and continuously rose in subsequent cultures. Similar lipoperoxidation concentrations were observed from zero to the 5th cell culture passage. From this passage, the levels of this oxidative stress marker started to rise. In the last cell culture passage analyzed here, AA cells presented higher lipoperoxidation levels than V allele cells (AV and VV). Protein carbonylation also presented variation in its concentration mainly between the 5th and 10th cell culture passages. However, VV cells showed higher protein carbonylation levels than others. DNA damage also changed the levels in relation to cell culture passage. The 8-deoxyguanosine levels began to rise from the first cell

culture passage and tended to maintain the same concentration in further passages. DNA damage was higher in AA than in VV cells. AV cells presented intermediary values when compared with homozygous cells for all oxidative stress markers analyzed here.



**Figure 5** Comparison oxidative markers among cell culture passages obtained from PBMCs carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes. NO=nitric oxide; S= superoxide, ROS = reactive oxygen. Statistical comparisons were performed by two- way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test and are commented in the text. Different letters (a, b, c) were used to identify statistical differences ( $p < 0.05$ ) among different cellular passages of each cell culture genotypes.

## Discussion

The present study evaluated the impact of genetic S-HP imbalance due to changes in the efficiency of the SOD2 enzyme, which has been associated with several chronic age-related diseases [9] on in vitro modulation of in vitro PBMCs immunosenescence. We will discuss the results obtained considering three aspects: general immunosenescence results observed in all cultures, differential results observed in PBMCs carriers different Val16Ala-SOD2 genotypes and the impact of these results on potential postponed aging interventions.

When PBMCs were chronically PHA activated, the following common immunosenescence patterns were observed in all cultures: higher cell proliferation rates; changes in cellular morphology; elevation in the levels of proinflammatory cytokines and oxidative stress

markers in the different cell culture passages. In contrast, S levels decreased in the older cultures when compared to younger cultures. In the 15th passage, cell cycle analysis showed arrestment in the G0/G1 phase of cells suggesting a proliferative senescence pattern. As rosette formation increased in the cultures, making it difficult to obtain aliquots to produce the next culture, we solved to finish the experiment in cellular this passage.

When the study was conceived, we expected a shorter extension of PBMC proliferation cultures than observed in nonactivated PBMCs, which is generally maintained in primary culture conditions for approximately 15 days. From this period, a subsequent decreasing in cellular proliferation markers an immunosenescence process [25]. This expectation is based on several investigations with humans and rats describing decreases in the lymphocyte proliferation PHA or LPS stimulated with age [35,36]. Surprisingly, PBMCs continually exposed to PHA antigen presented a proliferative hyperactivation process from intermediary and older cultures. Therefore, explaining these results could be considered a challenge.

In fact, one possible explanation of hyperactivation occurrence, as observed here, could be a process of promiscuous macrophage proliferation, which is observed in the presence of a subclinical chronic inflammatory process that is very common in elderly people [1,37]. Given that the initial percentage of macrophage in our cell cultures was similar among cells carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes, it would be very hard to accept this hypothesis. However, we don't know whether the proportion of macrophages and lymphocyte cells changed along the different cell culture passages. Unfortunately, it was not possible to follow the cultures to evaluate this aspect. Despite this limitation, it is conceivable that these differences could be related to changes in the proportion of macrophages, T- and B- lymphocytes, and NK cells in intermediary and older cultures. However, this hypothesis deserves to be tested in complementary studies. Independently of changes in the specific PBMC proportions, the hyperactivation observed in our cultures could be considered an immunosenescence process.

As the hyperactivation process was influenced by Val16Ala-SOD2 SNP, our results also suggested that this process is modulated, at some level, by oxidative metabolism, and are according to De la Fuente's suggestion about the occurrence of involvement of oxidative changes of the immune system in aging processes [38]. In relation to the SNP studied here, some studies analyzed partially this question. For example, Isbir et al [39] investigated the effect of Val17Ala-SOD2 SNP on the proinflammatory cytokine levels of patients undergoing coronary artery bypass grafting with a cardiopulmonary bypass. Although the authors did not show differences in the baseline IL-6 levels in patients carrying different SOD2 genotypes, postoperative analysis showed that V patients (VV and AV) presented higher IL levels than AA

patients. Therefore, this study demonstrated previously that Val16Ala- SOD2 SNP could influence inflammatory modulation, which includes positive modulation of IL-1 proinflammatory cytokines. Paludo et al [40] described Val16Ala- SOD2 SNP effects on the production of intracellular ROS by PBMCs with and without induction of lipopolysaccharides. These studies, performed by independent research groups, reinforce the suggestion that REDOX imbalance, especially involving the S and HP levels, could have some repercussions on inflammatory response [36].

The emergence of rosette formation was another result observed in the last five-cell culture passages. Multicellular rosettes are structures formed in embryonic development and nonembryonic development contexts. Multiple modes of rosette formation have been described in adult tissues or in vitro conditions. In blood, rosettes can be formed by cell-cell interactions, mainly between macrophages and red blood cells or macrophages and T-lymphocytes [41,42]. As in embryonic development, the biological relevance of rosette formation is well determined, in adult tissues, the biological role of rosettes is not very clear. In relation to immune cells, rosettes could present a mechanism related to control damaged or transformed cells into body. This hypothesis was studied by Hicks et al [43], evaluating the action of macrophages obtained from mice with spontaneous regression of multiple types of cancer (SR/CR). The authors observed that SR/CR macrophages did not use the classical mechanism to kill tumoral cells, as increase of reactive nitrogen species and ROS production. These immune cells form rosettes with cancer cells, in order to unleash their cytotoxic mechanisms, which induce apoptosis. Although this was not our focus, we could speculate that rosette formation in older cultures could be a protective mechanism against some cellular internal or external age-associated stressors. As we are constantly changing culture medium, some cell damage is expected, and accumulation of stressful molecules could cause macrophage and/or T-lymphocyte membrane modifications triggering the formation of rosettes. However, this hypothesis will need to be tested by future complementary investigations.

From these results, we believed that PBMCs exhibited an immunosenescence pattern when submitted chronically to PHA exposure in several cell culture passages. The results also showed that the general pattern of immunosenescence was not changed by a basal S-HP imbalance associated with Val16Ala-SOD2 SNP, i.e. proliferative hyperactivation, rosette formation, or an increase in the levels of oxidative and proinflammatory cytokines during cell culture passages. However, an S-HP imbalance had an influence on the speed and intensity of some immunosenescence markers, mainly at the levels of proinflammatory cytokine and oxidative stress markers. These differential responses observed here could be influenced by the



occurrence of variations in the oxidative and inflammatory levels in nonactivated PBMCs, as described in previous studies [15,17].

In 72-hour cell culture (zero passage), AA cells, which have a more highly efficient SOD2 enzyme, presented a faster and more intense immune response, whereas VV cells, which have lower SOD2 efficiency, presented a slower immune response. Similar results have been described in previous studies [23, 37, 44]. Although AA cells are more responsive to PHA activation, VV cells maintained higher cytokine levels in all the cell culture passages analyzed here. *In vitro* and *in vivo* investigations have reported an association between VV genotypes and high inflammatory cytokine levels [23,24,26,25]. Moreover, differential inflammatory modulation by drugs has been reported from *in vitro* and *in vivo* studies suggesting that VV cells could be more resistant to decreases in the levels of proinflammatory and oxidative markers [21,23]. For example, Duarte et al [25] evaluated the effect of rosuvastatin treatment (20 mg/day) in 120 hypercholesterolemics carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes. Rosuvastatin is a hypolipimiant drug with well-known anti-inflammatory properties. After 120 days, the authors observed that VV patients presented some resistance to lowering proinflammatory cytokine levels when compared with patients carriers A allele genotypes (AA and AV).

In contrast, higher oxidative stress markers were observed in AA PBMCs during cell culture passages, including lipoperoxidation and DNA damage, than in V allele PBMCs. This association is probably due to the higher basal HP levels produced from the higher SOD2 efficiency found in AA cells. As HP is membrane soluble, excess concentration of this molecule in mitochondria could migrate to cytoplasm reacting to metal ions, such as iron and zinc (Fenton reaction), which produce hydroxyl radicals and other prooxidant molecules. Hydroxyl radicals present a special high affinity with DNA molecules causing broken and chromosomal instability. Probably the higher production of hydroxyl radicals is one of the causal mechanisms related to a higher risk of AA subjects developing some cancer types, such as prostate, breast and lung cancer [10,11]. Therefore, our results are in line with previous investigations that associated higher DNA damage with AA cells [11,12,38].

In the inflammation context, an *in vitro* investigation showed that AA cells lipopolysaccharide activated presented a higher prooxidant state than VV cells [45]. The authors considered these results relevant in patients who have developed septicemia, which is a complication related to infectious diseases. In fact, AA patients present a high risk of developing septic shock and probably this risk is due to the overproduction of ROS and reactive nitrosative species associated with an intense inflammatory response [13].

Based on these results it is also relevant to perform some methodological considerations about the choice of whether to perform the experiments using PBMCs and not polymorphonuclear cells, which are also involved in the inflammatory metabolism. We chose PBMCs because these cells, when exposed to antigen, triggered an inflammatory cascade. In tissues, generally, resident macrophages (M1) are stimulated by antigens or injuries inducing inflammatory response by increasing proinflammatory cytokine levels, such as IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$ , as studied here. These processes induce the migration of other leukocytes, especially polymorphonuclear cell neutrophils, to the inflammatory site [3]. Under these terms, we opted to evaluate the influence of the S-HP imbalance on chronic inflammatory stimulation, which is a process closely associated with aging biology that mainly involves mononuclear cells, such as macrophages. Another important question related to our experimental design regards the use of PBMCs obtained from younger healthy subjects. We chose young human PBMCs because it is very difficult to obtain PBMCs from older people with some prior homeostasis alteration.

We based our choice on previous studies that showed important alterations in elderly people with healthy immune conditions compared with young adults [46,47]. A study observed higher cortisol levels in the elderly than in younger subjects, indicating an activation of the hypothalamic- pituitary-adrenal (HPA) axis. Cells obtained from elderly people also showed reduced counts of CD45RCD95+ cells than younger cells. In fact, it is very hard to find immune healthy older subjects that do not present physiological alterations or have previous chronic diseases associated with chronic inflammation and/or do not use daily medicine that could affect the experimental analysis. For example, in the studies previously cited [42, 43] the authors found just 46 noninstitutionalized healthy elderly people out of 1,118 subjects. These subjects were selected in accordance with the SENIEUR protocol that defines rigorous criteria for selecting strictly healthy individuals for immunogerontological studies. Moreover, *in vitro* aging studies, such as that performed by Pink et al [48], suggested that monocytes from elderly people present a higher basal production of proinflammatory cytokines, such as TNF $\alpha$ . Therefore, based on this evidence, we opted to evaluate the potential of *in vitro* senescence of PBMCs obtained just from younger subjects. Finally, another limitation in our investigation is related to the lack of analysis of antioxidant markers. In the present study, enzymatic and nonenzymatic antioxidant molecules were not evaluated by logistic questions involving a limited sample volume and complex processing of the samples to perform these analyses throughout cell cultures. Therefore, complementary studies need to be performed to evaluate the role of other antioxidant molecules than SOD2 in the results obtained here.

Moreover, despite methodological concerns related to *in vitro* investigations, all of the results suggested that a basal S-HP imbalance had an impact on the modulation of some aspects of immunosenescence, although the general pattern of this immune aging process triggered by PHA activation was conservative.

The two imbalanced SOD2 genotypes seem to have a negative impact on immune response cell carriers: whereas the high-SOD2 efficiency genotype (AA) produced higher levels of oxidative stress markers, the low-SOD2 efficiency genotype (VV) produced higher proinflammatory cytokine levels than AV cells. Both situations could explain why these genotypes have been associated with diseases related to chronic inflammatory patterns, such as cancer, and cardiovascular and metabolic disorders [9,10].

The role of an S-HP imbalance in proliferative cytokines and oxidative molecules from PBMC culture passages could be related to the role of S and HP in inflammatory modulation. A large number of studies have suggested the relevance of oxidative metabolism in inflammatory response. First, tissue injury leads to the production of ROS, including S and HP molecules generating oxidative stress [49]. Second, the elevation of some types of ROS molecules has also been associated with chronic regeneration of wounds. This is the case with HP molecules, whose rapid production in response to wounding is considered essential in minimizing infection risk, and in activating the epithelial signaling pathways necessary for triggering epidermal regeneration. Moreover, the increase in HP levels has a role in recruiting neutrophils and other immune cells to the wound site [51]. On the other hand, phagocytes also generate ROS molecules. Macrophages in particular produce high levels of NO associated with its phagocytic activity. As is well known, at low concentrations NO is considered an important signaling molecule. In contrast, high NO concentrations produced by macrophages at the injury site interfere directly, since it is highly reactive with S, and this reaction generates peroxynitrite, which can cause extensive membrane lipoperoxidation [50]. As AA causes increases in basal HP levels, whereas VV causes increases in S basal levels, this condition could potentially affect the inflammatory response of PBMCs continually exposed to PHA. Although the mechanisms related to the S-HP imbalance in chronic inflammatory induction need to be clarified, the results described here corroborate the theory, which preconizes the involvement of the immune system in the aging process of the organism by alterations in the oxi-inflammatory balance [51].

Finally, it is important to discuss the potential relevance of our findings for preventing chronic morbidities associated with an oxi-inflammatory imbalance and for postponing aging processes associated with body dysfunctions. As postulated previously by De la Fuente and Miguel [53], the confirmation of the central role of oxi-inflammatory aging could be through the

administration of adequate dietary richest in antioxidant molecules [52]. It is important to point out that several foods that present antioxidant properties also have anti-inflammatory effects [x]. Previous results obtained from Val16Ala-SOD2 epidemiological studies could also be used to corroborate indirectly the oxi-inflamm-aging theory. This is the case with investigations involving cancer risk with Val16Ala-SOD2 and dietary pattern interactions [53,54,55,56].

Although an *in vitro* investigation performed by Capeleto et al [25] suggested that the interaction between the genetic imbalance caused by Val16Ala-SOD2 SNP and resveratrol, a powerful molecule associated with lifespan extension, could modulate differentially inflammatory patterns, strategies aimed at improving the redox state of the immune system [57] could be considered essential for minimizing degenerative aging processes.

## **Acknowledgments**

The study described was supported by grants and fellowships from Brazilian research agencies (CNPq and CAPES). We wish to express our thanks to Beatriz da Rosa Bonadiman, Charles Elias Assmann, Dianni Capeleto and Cibele Ferreira Teixeira for their help with cell culture management.

## **Author Disclosure Statement**

No competing financial interests exist. F.B., V.F.A., M.M.M.F.D.: cell culture, analysis and data interpretation. F.B., E.E.R., I.B.M.C.: study concept, design, data interpretation, manuscript writing

## **REFERENCES**

- 1 Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N York Acad Sci* 2000; 908:244–254.
- 2 Alvarez E, Machado A, Sobrino F, Santa Maria C. Nitric oxide and superoxide anion production decrease with age in resident and activated rat peritoneal macrophages. *Cell Immunol* 1996; 169:152–155.
- 3 Goronzy JJ, Fang F, Cavanagh MM, Qi Q, Weyand CM. Naive T cell maintenance and function in human aging. *J Immunol* 2015; 194 (9):4073–4080.
- 4 Fulop T, Witkowski JM, Le Page A, Fortin C, Pawelec G, Larbi A. Intracellular signalling pathways: targets to reverse immunosenescence. *Clin Exp Immunol* 2016; [Epub ahead of print] doi: 10.1111/cei.12836.

- 5 Montgomery RR, Shaw AC. Paradoxical changes in innate immunity in aging: recent progress and new directions. *J Leukoc Biol* 2015; 98(6):937–943.
- 6 Alvarez E, Machado A, Sobrino F, Santa Maria C. Nitric oxide and superoxide anion production decrease with age in resident and activated rat peritoneal macrophages. *Cell Immunol* 1996; 169:152–155.
- 7 Fujimoto H, Kobayashi H, Ohno M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein. *Circ J* 2010; 74(2):353–360.
- 8 Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacog* 2003; 13(3):145–157.
- 9 Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res* 2013; 47:781–792.
- 10 Bresciani G, da Cruz IB, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem* 2015; 68:87–130.
- 11 Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IB. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60(4):432–438.
- 12 Paludo FJ, Picanço JB, Fallavena PR, Fraga Lda R, Graebin P, Nóbrega Ode T, Dias FS, Alho CS. Higher frequency of septic shock in septic patients with the 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene. *Gene* 2013; 15:106–111.
- 13 Fujimoto H, Kobayashi H, Ogasawara K, Yamakado M, Ohno M. Association of the manganese superoxide dismutase polymorphism with vasospastic angina pectoris. *J Cardiol* 2010; 55(2):205–210.
- 14 Souiden Y, Mallouli H, Meskhi S, Chaabouni Y, Rebai A, Chéour F, Mahdouani K. MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. *Biol Res* 2016; 49.
- 15 Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Da Cruz IB, Schetinger MR, Loro VL. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem* 2010; 43:18–23.
- 16 Chen H, Yu M, Li M, Zhao R, Zhu Q, Zhou W, Lu M, Lu Y, Zheng T, Jiang J, Zhao W, Xiang K, Jia W, Liu L. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem* 2012; 363(1–2):85–91.

- 17 Montano MA, Barrio Lera JP, Gottlieb MG, Schwanke CH, da Rocha MI, Manica- Cattani MF, dos Santos GF, da Cruz IB. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol Cell Biochem* 2009; 328(1–2):33–40.
- 18 Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Müssel DP, da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res* 2005; 30(4):691–703.
- 19 Pourvali K, Abbasi M, Mottaghi A. Role of superoxide dismutase 2 gene Ala16Val polymorphism and total antioxidant capacity in diabetes and its complications. *Avicenna J Med Biotechnol* 2016; 8(2):48–56.
- 20 Gurbuzler L, Sogut E, Koc S, Eyibilen A, Yelken K, Senkal HA, Aksakal C. Manganese-superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 polymorphisms in recurrent tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2012; 76(9):1270–1273.
- 21 Despotovic M, Stoimenov TJ, Stankovic I, Pavlovic D, Sokolovic D, Cvetkovic T, Kocic G, Basic J, Veljkovic A, Djordjevic B. Gene polymorphisms of tumor necrosis factor alpha and antioxidant enzymes in bronchial asthma. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24(2):251–256.
- 22 Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, Krewer Cda C, da Rocha MI, Mânica- Cattani MF, Soares FA, Rosa G, Maris AF, Battiston FG, Trott A, Lera JP. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2012; 60(1):30–33.
- 23 Barbisan F, Motta R, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MM, Mostardeiro CP, Unfer TC, Schott KL, da Cruz IB. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS ONE* 2014; 9(10):e107299.
- 24 Duarte T, da Cruz IBM, Barbisan F, Capelleto D, Moresco RN, Duarte MMMF. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytics blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese- dependent gene polymorphism. *Pharmacogenomics J* 2016; [Epub ahead of print] doi: 10.1038/tpj.2015.91.
- 25 Capeleto D, Barbisan F, Azzolin V, Dornelles E B, Rogalski F, Teixeira CF, Machado A K, Cadoná F C, Silva T, Duarte T, Duarte MMMF, Cruz IBM . The anti- inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. *Biogeront* 2015; 16(5): 621–630.
- 26 Ceuppens JL, Baroja ML, Lorre K, Van Damme J, Billiau A. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol* 1988; 141(11):3868–3874.
- 27 Bouchenak M, Lamri-Senhadjj M. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review. *J Med Food* 2013; 16 (3):185–198.
- 28 Jung IEC, Machado AK, Cruz IBM, Barbisan F, Azzolin1 VF, Duarte T, Duarte MMMF, Prado-Lima PAS, Bochi GV, Scola G, Moresco RN. Haloperidol and risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW

264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. *Psychopharmacology (Berl.)* 2016; 233(9):1715–1723.

29 Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, Berto MD, Barbisan F, Dornelles EB, Glanzner WG, Gonçalves PB, Bica CG, da Cruz IB. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol In Vitro* 2016; 32:8–15.

30 Tatsch E, Bochi GV, Pereira Rda S, Kober H, Agertt VA, de Campos MM, Gomes P, Duarte MM, Moresco RN. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* 2011; 44(4):348–350.

31 Morabito C, Rovetta F, Bizzarri M, Mazzoleni G, Fanò G, Marigliò MA. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: a real-time, single-cell approach. *Free Radic Biol Med* 2010; 48(4):579–589.

32 Chibber S, Hassan I, Farhan M, Naseem I. In vitro pro-oxidant action of Methotrexate in presence of white light. *J Photochem Photobiol B* 2011; 104:387– 393.

33 Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis human of malondialdehyde in body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(2):251–256.

34 Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142(2):231–255.

35 De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 2009; 15(26):3003–3026.

36 Toda IM, Vida C, Ortega E, De La Fuente M. Hsp70 basal levels, a tissue marker of the rate of aging and longevity in mice. *Exp Gerontol.* 2016; 84:21–28.

37 Wang GC, Casolaro V. Immunologic changes in frail older adults. *Tranl Med UniSa* 2014; 24(9):1–6.

38 De la Fuente M1. Role of neuroimmunomodulation in aging. *Neuroimmunomodulation.* 2008;15(4–6):213–223.

39 Isbir S, Ergen A, Yilmaz H, Tekeli A, Arsan S. Effect of Ala16Val genetic polymorphism of MnSOD on antioxidant capacity and inflammatory response in open heart surgery. *In Vivo.* 2008; 22(1):147–151.

40 Paludo FJ, Bristot IJ, Alho CS, Gelain DP, Moreira JC. Effects of 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene in the production of intracellular reactive species in peripheral blood mononuclear cells with and without lipopolysaccharides induction. *Free Radic Res* 2014; 48(2):190–199.

41 Cabral HR, Novak IT. Autologous rosette formation by human blood monocyte- derived macrophages and lymphocytes. *Am J Hematol* 1999; 60(4):285–288.

- 42 Cabral HR, Novak I. Spontaneous formation of rosettes by autologous human monocyte-macrophages and lymphocytes in cell cultures. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba* 1992; 50(2):25–26.
- 43 Hicks AM, Willingham MC, Du W, Pang CS, Old LJ, Cui Z. Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of macrophages in SR/CR mice. *Cancer Immun* 2006; 31:6–11.
- 44 dos Santos Montagner GF, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MM, da Cruz IB. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol In Vitro* 2010; 24:1410–1416.
- 45 Paludo FJ, Simões-Pires A, Alho CS, Gelain DP, Moreira JC. Participation of 47C>T SNP (Ala-9Val polymorphism) of the SOD2 gene in the intracellular environment of human peripheral blood mononuclear cells with and without lipopolysaccharides. *Mol Cell Biochem* 2013; 372(1–2):127–135.
- 46 Collaziol D, Luz C, Dornelles F, da Cruz IM, Bauer ME. Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing. *Mech Ageing Dev* 2004; 125(3):219–227.
- 47 Luz C, Dornelles F, Preissler T, Collaziol D, da Cruz IM, Bauer ME. Impact of psychological and endocrine factors on cytokine production of healthy elderly people. *Mech Ageing Dev* 2003; 124(8–9):887–895.
- 48 Pinke KH, Calzavara B, Faria PF, do Nascimento MP, Venturini J, Lara VS. Proinflammatory profile of in vitro monocytes in the ageing is affected by lymphocytes presence. *Immun Ageing* 2013; 10(1):22–26.
- 49 Van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem* 2014; 115(3):427–435.
- 50 Lonkar P, Dedon PC. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer* 2011; 128(9):1999–2009.
- 51 De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 2009; 15(26):3003–3026.
- 52 Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, Krewer Cda C, da Rocha MI, Mânica-Cattani MF, Soares FA, Rosa G, Maris AF, Battiston FG, Trott A, Lera JP. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2012; 60(1):30–33.
- 53 Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, Graham S, Laughlin R, Shields PG. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 1999; 1;59(3):602–606.



54 Kang D, Lee KM, Park SK, Berndt SI, Peters U, Reding D, Chatterjee N, Welch R, Chanock S, Huang WY, Hayes RB. Functional variant of manganese superoxide dismutase (SOD2 V16A) polymorphism is associated with prostate cancer risk in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(8):1581–1586.

55 Choi JY, Neuhauser ML, Barnett MJ, Hong CC, Kristal AR, Thornquist MD, King IB, Goodman GE, Ambrosone CB. Iron intake, oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort. *Carcinogenesis* 2008; 29(5):964–970.

56 Mikhak B, Hunter DJ, Spiegelman D, Platz EA, Wu K, Erdman JW Jr, Giovannucci E. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2008; 29(12):2335–2340.

57 De la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, Ortega E. Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des* 2011; 1;17(36):3966–3993.

## 4.2 ARTIGO 2

### **Genetic and Pharmacological Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance modulate *in vitro* Lithium effects on Glycogen synthase kinase-3 $\beta$**

Fernanda Barbisan<sup>1</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>1</sup>, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima<sup>2</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>3</sup>, Glauber Wagner<sup>4</sup>, Thiago Duarte<sup>1</sup>, Ivana B. M. da Cruz<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup> BraIn Institute, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>3</sup> Lutheran University of Brazil, Santa Maria- RS, Brazil

<sup>4</sup> Federal University of Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brazil

<sup>5</sup>Postgraduate program of Gerontology Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

\* Corresponding author: Ivana Beatrice Mânica da Cruz. Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria, RS, Brazil, Zip Code: 97105900. Phone: +55 55 32208163, E-mail: ibmcruz@hotmail.com

## Abstract

**Introduction:** Lithium (Li), a mood stabilizer used to treat bipolar disorder (BP) symptoms has important anti-inflammatory effects by downregulation of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ ). However, sometime Li effect is not efficient in some patients suggesting genetic interference. Previous investigations described association between a genetic superoxide-hydrogen (S-HP) imbalance caused by a superoxide dismutase manganese dependent gene polymorphism (Val16Ala-SOD2 SNP, rs4880) and differential anti-inflammatory response of some drugs and bioactive molecules. Therefore, we postulated here that S-HP imbalance could present some effect on GSK-3 $\beta$  modulation by Li. **Methods:** to test this hypothesis, a genetic and a pharmacological S-HP imbalance protocols were performed. In the two protocols, immune cells were activated by phytohemagglutinin (PHA). The first one, used peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultures carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes, and the second used a commercial RAW 264.7 macrophage cell line. Macrophages were exposed to paraquat to induce high S levels (VV-like cells) or porphyrin, that is a SOD2-like molecule that increase dismutation of S into HP (AA-like cells). In both protocols the Li effects on GSK-3 $\beta$  gene and protein modulation as evaluated in 24 h cultures. The inflammatory activation was also analyzed by cellular proliferation in 72 h cell cultures. **Results:** as expected PHA exposure triggered a strong upregulation of GSK-3 $\beta$  gene expression, and Li exposure showed GSK-3 $\beta$  down gene downregulation from 0.7 mEq/L concentrations. However, in protocols, Li modulatory effects on GSK-3 $\beta$  gene and protein expression was directly influenced by basal S-HP balance. Presence of high S-basal levels (VV genotype and VV-like cells) induced attenuated Li anti-inflammatory effects in comparison with balanced and AA and AA-like cells. This effect was also confirmed when cellular proliferation was analyzed in 72 h cell cultures. Despite, methodological limitations related to *in vitro* assays, the whole of results suggested that Li anti-inflammatory effects is influenced by S-HP basal state and is plausible that its influence could contribute to resistance of some patients to Li treatment or to increase of intensity of some side effects Li-associated.

**Keywords:** PBMC; genotype; inflammation; SOD2, bipolar disorder, oxidative metabolism

## Introduction

Bipolar disorder (BP) is a psychiatric disorder associated with chronic inflammatory pattern, oxidative stress and mitochondrial dysfunction (Czarny et al., 2017). Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 $\beta$ ) is a key molecule associated with these alterations in BP disorder. GSK-3 $\beta$  is a serine/threonine kinase, expressed in all mammalian tissues, which was initially identified as a phosphorylating and an inactivating agent of glycogen synthase. Currently, evidence have showed that GSK-3 $\beta$  has pleiotropic and central role in cellular signaling and regulation of cell proliferation. This enzyme is essential for the central nervous system regulating neurotransmission, synaptic plasticity, apoptosis and neurogenesis (Muneer, 2016; Cole, 2013; Muneer, 2017). At contrary, GSK-3 $\beta$  dysregulation triggering its hyperactivation, has been associated with pathophysiology of several diseases, as occur in BP

(BP) (Cole, 2013; Muneer, 2017). Moreover, elevated GSK-3 $\beta$  levels in BD has been related to chronic inflammatory processes stimulating the production of several proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and inhibiting the production of interleukin 10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine (Luca et al., 2016; Muneer et al., 2016).

BP symptoms can be controlled by lithium (Li) that some pharmacological involve inhibition of GSK-3 $\beta$  enzyme (Munneer et al 2016). Several studies suggest that inhibition of GSK-3 $\beta$  could, at least in part, explain Li beneficial effects on BP and its superiority in terms of clinical efficacy when compared with other pharmacological drugs (Luca et al., 2016). Unfortunately, just about 30% of BD patients are responsive to Li, suggesting that its action has different levels of magnitude. Differences among Li efficacy probably are influenced by cellular microenvironmental factors, such as basal oxidative metabolism genetically determined (Sutton et al., 2003).

Genetic studies described important association between superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance on inflammatory and oxidative response. This is the case a single nucleotide polymorphism (SNP) located in codon 16 of superoxide dismutase manganese-dependent enzyme (MnSOD, SOD2), that belongs a little peptide sequence that trigger inactive-SOD2 into mitochondria (mitochondrial target sequence, MTS). In this codon, an alanine amino acid substitutes a valine amino acid, causing a protein conformational change. The V-allele produces a beta-sheet SOD2, which has difficulty entering into mitochondria, and are partially trapped in the membrane of this organelle. This phenotype decreases SOD2 enzyme availability producing higher S levels by VV than A-allele genotypes. On the other hand, A-allele produces alpha-helix SOD2 protein, and AA produces higher HP levels than V-allele genotypes (Sutton et al., 2003; Bresciani et al., 2015).

Prior investigations have suggested that, both SOD2 homozygous genotypes are associated to risk of chronic diseases (Bresciani et al., 2015). Moreover, *in vitro* studies suggested that Val16Ala-SOD2 SNP is associated with differential inflammatory and oxidative response to pharmacological drugs and bioactive molecules found in some foods (Montano et al., 2009; Barbisan et al., 2014; Capeleto et al., 2015; Schott et al., 2017). A clinical assay also described pharmacogenetic effect of Val16Ala-SNP on resistance rosuvastatin treatment of hypercholesterolemic patients (Duarte et al., 2017).

Recent results *in vitro* also suggested that S-HP imbalance associated to Val16Ala-SOD2 could affect the intensity of some immunosenescence markers. Whereas AA-cells presented an intense and short inflammatory response, VV-cells presented higher and chronified inflammatory response (Barbisan et al., 2017). The potential effects of S-HP imbalance on

cellular function was also evaluated by a pharmacological model that used paraquat to generate higher superoxide levels and porphyrin that act as a SOD2-like enzyme (Azzolin et al., 2016; Berto et al., 2016).

As until moment S-HP effects on GSK-3 $\beta$  modulation by Li was not studied we performed here an *in vitro* study using a genetic and pharmacological *in vitro* protocols. Both protocols evaluated the influence of S-HP imbalance on Li inhibitory action of GSK-3 $\beta$  expression. In the first protocol, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Val16Ala-SOD2 SNP genotypes were Li-exposed, and in the second protocol, a pharmacological S-HP imbalance was induced in the RAW-264.7 macrophage cells, with Li exposure.

## Materials and methods

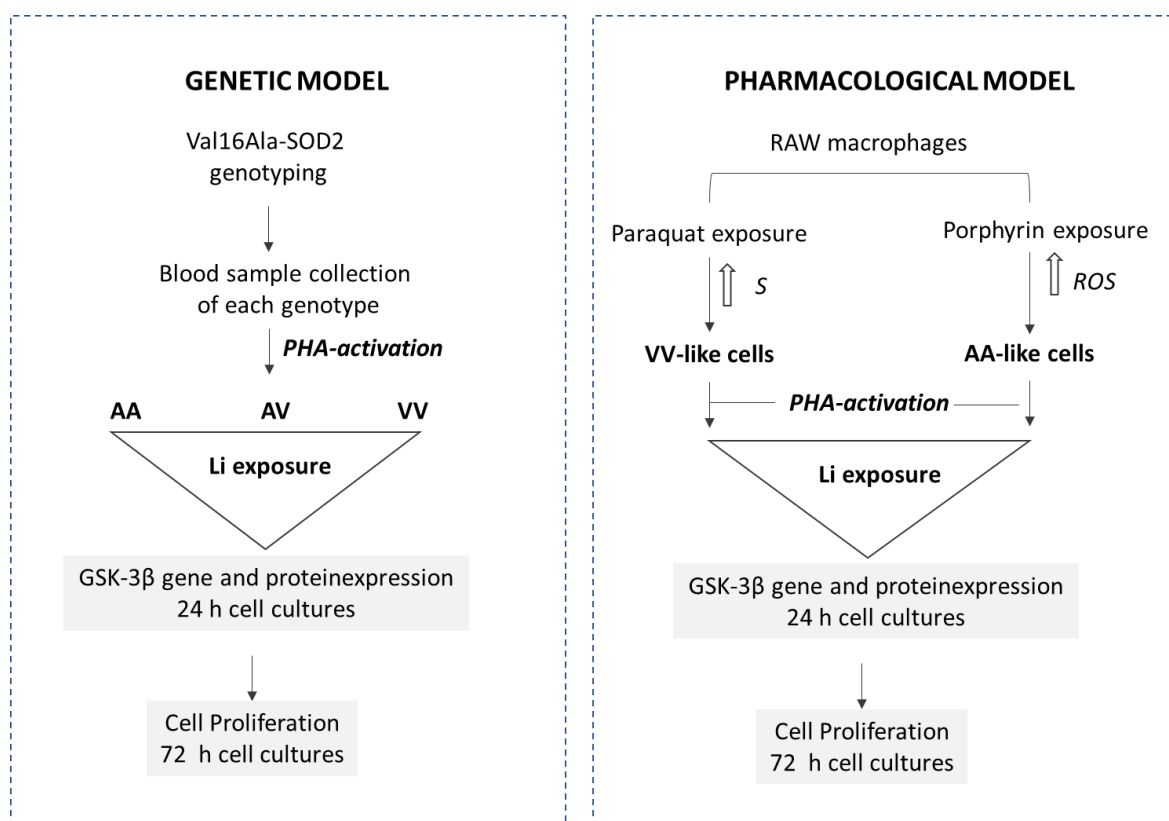
### Chemical reagents and equipment

To perform the experiments, all chemicals and solvents in this study were Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri, United States of the America), MnTBAP (Porphyrin) Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, United States of the America). Materials used in cell cultures as purchased from the purchased from Vitrocell-Embriolife (Campinas, São Paulo, Brazil) and Gibco-Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, United States of the America). Molecular biology reagents were obtained from the companies Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany) , Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, United States of the America) and Bio-Rad Laboratories ( Hercules, Kalifornien, United States of the America). Assay total GSK-3 $\beta$  levels in cell lysates was obtained from Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, United States of the America). The protocols involving spectrophotometric analysis were performed in a 96-microplate reader (SpectraMax M2/M2e Multimode Plate Reader; Molecular Devices- Sunnyvale, Kalifornien, United States of the America).

### General *in vitro* design

Two protocols were performed to evaluate the influence of S-HP imbalance on Li inhibitory GSK-3 $\beta$  effects. Genetic S-HP imbalance used PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes, whereas pharmacological imbalance used RAW 264.7 macrophage cell line exposed to paraquat, as generator of superoxide anion levels and porphyrin as a SOD2-like molecule. The pharmacological model was based in a previous studies performed by Azzolin et al (2015).

Figure 1 presents a comparative synthesis of the main steps of two protocols. As Li is an anti-inflammatory molecule, both PBMCs and RAW cells were activated by phytohemagglutinin (PHA) at 125 µg/ml concentration as previously used by Barbisan et al (2017) when analyzing the Val16Ala-SOD2 effects on PBMCs chronic inflammatory response. PHA was chosen as the PBMC mitogenic activator since, because it is a lectin found in several types of foods habitually consumed by human beings including peas, peanuts, soybeans, dry beans, broad beans, dry peas, lentils and others and triggers a non-microbiological inflammatory response [Bouchenak et al., 2013]. Pharmacological S-HP imbalance of macrophage cells was confirmed by quantification of superoxide and reactive oxygen species (ROS) levels in 24 h cell cultures. Cells exposed to paraquat that presented higher superoxide levels were named VV-like cells whereas cells exposed to porphyrin that presented higher ROS levels were named AA-like cells. In the two models, GSK-3β gene and protein expression were determined in 24 cell cultures. Confirmation of differential inflammatory modulation by Li and S-HP imbalance interaction was determined by analysis of proliferative rate in 72 h cell cultures.



**Figure 1** General experimental design used to evaluate the impact of S-HP imbalance on Li inhibitory GSK-3 $\beta$  effects. First protocol used Val16Ala-SOD2 SNP PBMCs cells that present a genetic S-HP imbalance due changes in the SOD2 enzyme efficiency into mitochondria. VV-PBMCs present a higher S basal level whereas AA-PBMCs present higher ROS basal levels. Second protocol used RAW 264.7 macrophages cells exposed to paraquat in order to generate higher S levels inducing a VV-like oxidative state and exposed to porphyrin in order to generate higher ROS levels inducing a AA-like oxidative state.

### S-HP Genetic Imbalance Protocol

This protocol is part of a research project previously approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, Brazil (N<sup>o</sup>116 23081.015838/201110), and all blood-cell donors signed a consent form. Blood samples with different Val16Ala-SOD2 genotypes were obtained from a databank that included 120 subjects previously genotyped to SOD2-SNP as described in Barbisan et al [12].

Volunteers selection from databank considered biological and lifestyle similarities in order to decrease potential environmental influence on results obtained from *in vitro* assays. Therefore, we excluded smokers, obese, athletes, or consumers of daily multivitamin supplements subjects, as well as individuals with previous some chronic degenerative diseases. To minimize some effects on oxidative metabolism of blood samples used to perform

Val16Ala-SOD2 protocol, we instructed volunteers to avoid eat/drink antioxidant foods such as vegetables and fruits before 24 hours blood collection.

The first protocol used PBMCs sample obtained from twelve blood samples for each Val16Ala-SOD2 genotypes. To produce cell cultures, blood samples were collected (~10 mL by venopuncture), and each volunteer donated, three times to perform all experiments in triplicate.

PBMCs cells were isolated by Histopaque® 1077, density gradient cell separation by centrifuged for 20 min at 1342 g. From the PBMCs of each volunteer the cell culture was started with a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL, was placed in each of 96-well plates ( $1 \times 10^5$  cells/well). And cultured in RPMI 1640 culture medium with 10 % fetal bovine serum and 1% antibiotics ( Penicillin/Streptomycin) and 1% antifungal (Amphotericin B) (at 37°C in a humidified 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere for 24 hours. After cell attachment, the cultures were treated with Li for 24 and 72 h in order to produce the assays.

Before to conduct the general experimental, a Li-curve concentration was performed to determine its effect on GSK-3 $\beta$  expression, using as reference cells carrying AV balanced-genotype. AV-cells were treated with Li at 0,17-0,35-0,70-1,40-2,80 mEq/L, and determination of gene expression GSK-3 $\beta$  was evaluated in 24 h cell-cultures. From this initial analysis a best Li concentration that inhibit GSK-3 $\beta$  gene expression was choose to perform the comparative analysis among different Val16Ala-SOD2 PBMCs.

#### S-HP pharmacological imbalance protocol

To confirm that S-HP could has some effect on GSK-3 $\beta$  gene and protein modulation by Li exposure, a pharmacological protocol was used similar to described in Azzolin et al (2016). However, at contrary of Azzolin et al that used colorectal cancer cells, we used a *Mus musculus* macrophage cell line (ATCC® TIB-71™ — Rio de Janeiro Cell Bank, RJCB 0212, Brazil). We opted to use a non-human cell to avoid potential influence of Val16Ala-SOD2 SNP. Macrophages were cultured in RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum (FBS), supplemented with 1% antibiotics ( Penicillin/Streptomycin) and 1% antifungal (Amphotericin B). The cells were maintained at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and were expanded by obtaining the optimal amount for the experiments. To perform the experiments, cell suspension was placed in each of 96-well plates ( $1 \times 10^5$  cells/well). Further cell attachment, the cultures were treated with paraquat or porphyrin, in order to generate a S-HP imbalance. Paraquat exposure generated cells with higher S levels control, that were named VV-like cells. Porphyrin exposure generate cells with

higher ROS levels and were named AA-like cells. To confirm the pharmacological imbalance S and ROS levels were quantified in 24 h cell cultures. S levels were determined through a colorimetric protocol following instructions published by Morabito et al., (2010), and absorbance was determined at 540 nm wavelength. ROS levels was determined using the The effect of 24 h of MTX exposure on the oxidative metabolism of PBMCs from carriers of different Ala16Val-SOD2 genotypes was evaluated for different oxidant and antioxidant variables. The ROS level was determined using the 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. In this technique, the DCFDA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. The fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm, and the results were expressed as picomoles/mL of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) production from 2',7'-dichlorofluorescein in reaction with ROS molecules present in the samples (Barbisan et al., 2014).

#### GSK-3 $\beta$ quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) gene expression

Total RNA was extracted using Trizol, following manufacturer's instructions (Ludwing-Biotec, Brazil). The extracted RNA was measured by Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer at the 532 nm wavelength. For realizing the reverse transcription, RNA was used, whereby the samples of RNA (1  $\mu$ g/mL) were added to 0.2  $\mu$ L of DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 5 min, followed by heating at 65 °C for 10 min. The cDNA was generated with 1  $\mu$ L of Iscript cDNA and 4  $\mu$ L of Mix Iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA-USA). The reaction consisted of the following steps: heating at 25 °C for 5 min, at 42 °C for 30 min, and at 85 °C for 5 min, followed by incubation at 5 °C for 60 min. Real time PCR was performed as previously described by Barbisan et al. (2014) using a QuantiFast SYBR® Green PCR Kit in a real time machine Rotor Gene®. The specific sequence of the gene GSK-3 $\beta$  human is Forward: '5-'-CTCCCCCGTTGACATAGTCG 3' and Reverse '5 GCAGGAACCTGGAGTTTTCA 3'. For the *Mus musculus* cell the sequence GSK-3 $\beta$  is Forward : 5'-CTCTGGCCACCATCCTTATC-3' and Reverse 5'-CACGGTCTCCAGCATTAGTATC-3'. Beta-actin ( $\beta$ -actin) was used as housekeeping gene to normalize all gene expression of tested samples.

#### GSK-3 $\beta$ immunoassay protein quantification



Levels of GSK-3 $\beta$  protein were quantified in cell culture supernatant using the Elisa Immunoassay following the manufacturer instructions (Thermo Fischer Scientific®). According to the manufacturer's information, briefly, the kit uses a monoclonal antibody to GSK-3 $\beta$ , precoated in a microplate to bind the GSK-3 $\beta$  in the or sample. Further one-hour incubation, the excess samples is washed out and a rabbit polyclonal antibody to GSK-3 $\beta$ , is added. This antibody binds to GSK-3 $\beta$ , captured on the plate. The polyclonal antibody detects a non-phosphorylated region on GSK-3 $\beta$ , and therefore detects GSK-3 $\beta$ , regardless on phosphorylation status. After a one hour incubation, the excess antibody is washed out and secondary conjugate is added, which binds to the polyclonal one hour incubation antibody. Excess conjugated is washed out and substrate is added. After a one hour incubation, the is stop solution is added and the colour generated is read a 450nm in plate reader.

#### Cellular proliferative assay

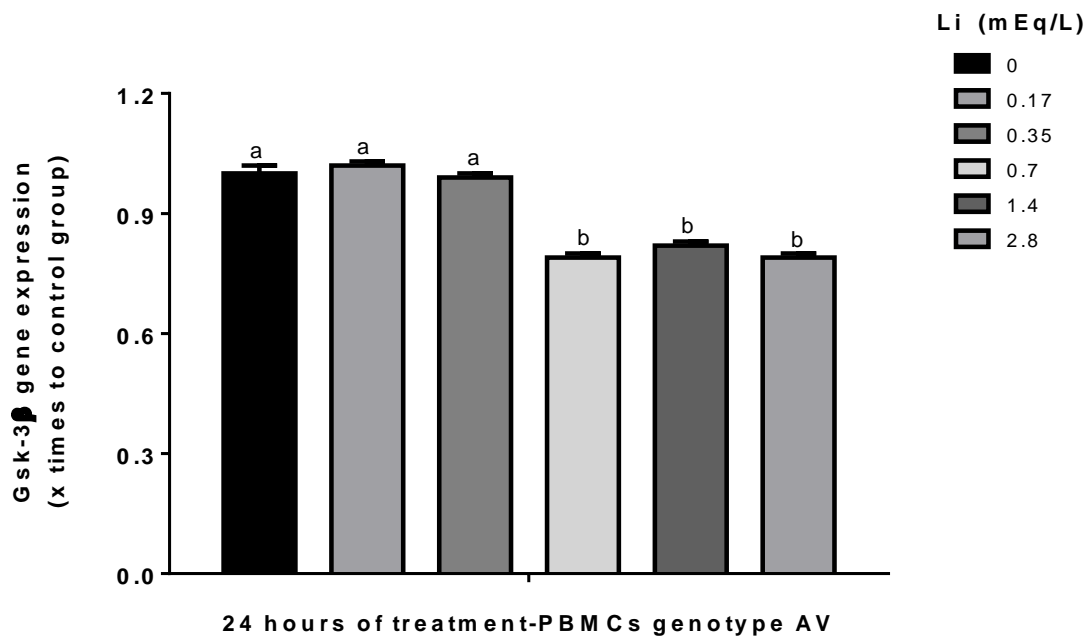
Inflammatory status of cells was confirmed by proliferative state of 72 h cell cultures. In general, activated cells the proliferation rate is higher than non-activated cells. This last was conducted to validate the Li anti-inflammatory effects and the potential impact of S-HP in this effect by GSK-3 $\beta$  inhibition. Cellular proliferation was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] spectrophotometric assay, as described by dos Dal Berto et al. (2015). For this assay, the cells were incubated for 1 hour with MTT reagent. After formazan salt was dissolved with dimethylsulfoxide (DMSO), absorbance was measured at 560 nm in a plate 96-well.

#### Statistical analyses

The statistical analyses were performed using the program Graph pad prism 5 with the one-way of variance followed by Dunnet *post hoc* test or two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test when the interaction between Val16Ala-SOD2 and Li or between S-HP pharmacological imbalance was analyzed. P values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

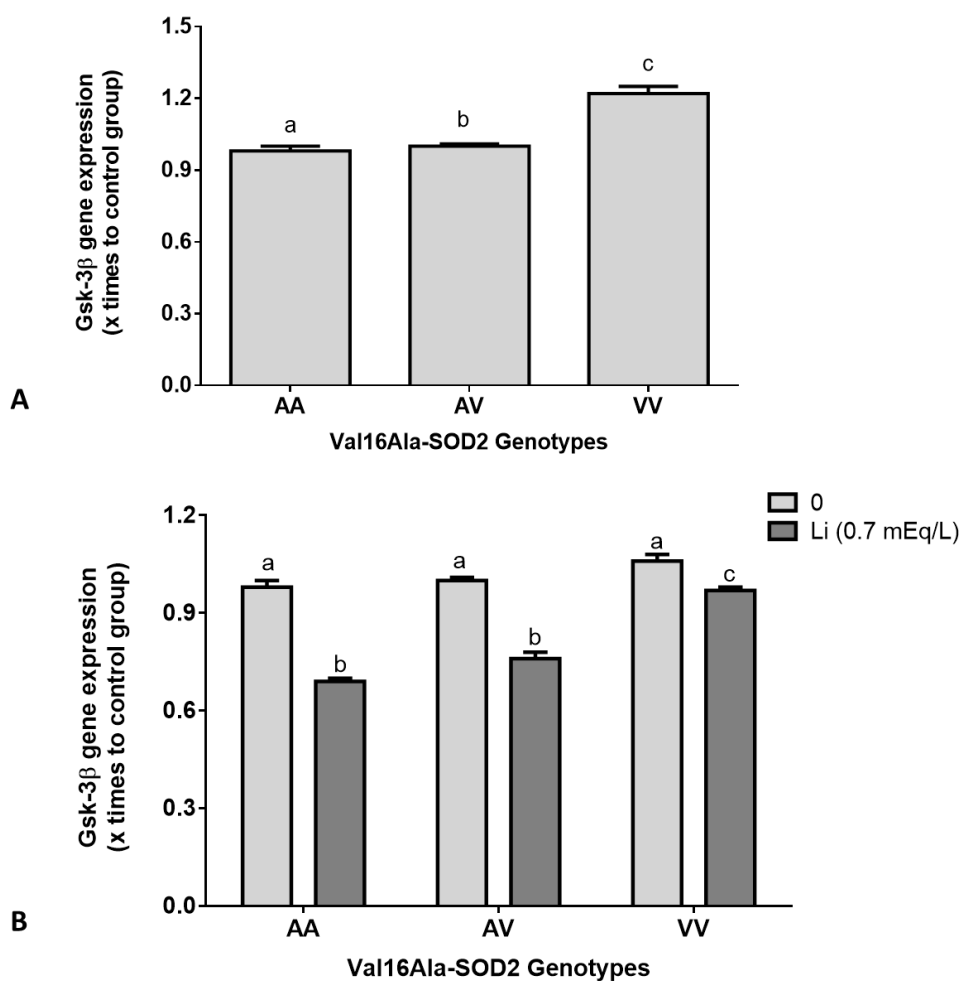
## Results

As expected, AV-PBMCs used as reference and exposed to Li at different concentrations presented GSK-3 $\beta$  gene down-regulation. However, this effect was observed just cells were exposed to > 0.7 mEq/L concentrations (Figure 2). From these results, just Li at 0.7 mEq/L concentration was used to evaluate the potential effect of Val16Ala-SOD2 SNP in its GSK-3 $\beta$  inhibitory effects.



**Figure 2** Comparison of GSK-3 $\beta$  gene modulation in PBMCs exposed to lithium (Li) at different concentrations. Gene expression was normalized by  $\beta$ -actin housekeeping gene. Values lower than 1 indicates gene downregulation, values higher than 1 indicate up-regulation gene expression, when compared with control group. Analysis were performed in 24 hours cell cultures and compared by Two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. Statistical differences among GSK-3 $\beta$  among treatments were identified by different letters (a, b).

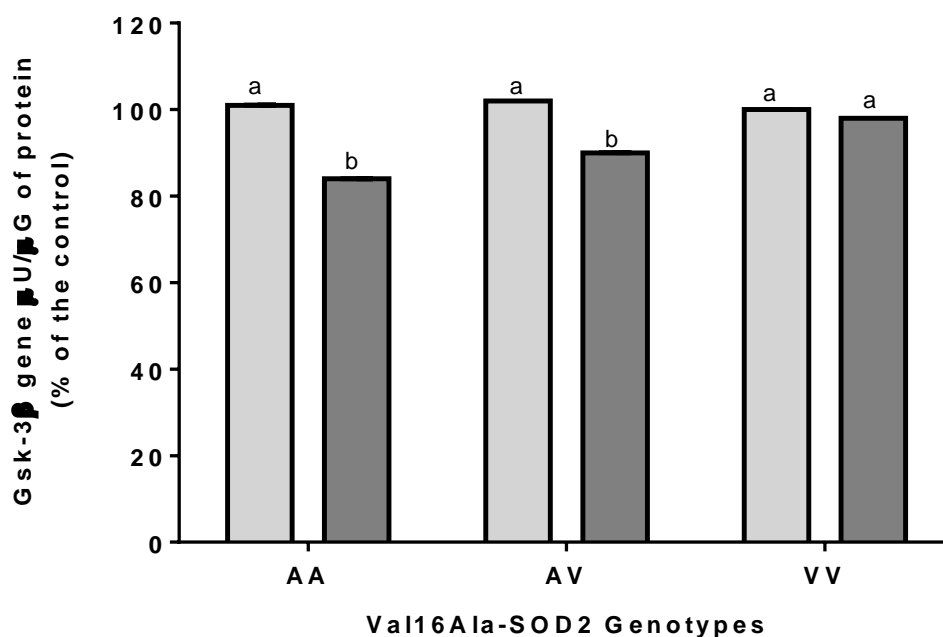
Before the analysis of influence of S-HP imbalance caused by Val16Ala-SOD2 SNP on Li GSK-3 $\beta$  inhibitory effects, the GSK-3 $\beta$  expression was compared among genotypes. VV-cells presented more intense GSK-3 $\beta$  up-regulation than other AA cells using AV-activated cells as reference (Figure 3A).



**Figure 3** GSK-3 $\beta$  gene expression modulation: (A) activated PBMCs carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes (AA, AV and VV) (B) influence of Val16Ala-SOD2 on GSK-3 $\beta$  gene expression Li exposed in 24 h cell cultures. Gene expression was normalized by  $\beta$ -actin housekeeping gene. Values lower than 1 indicates gene downregulation, values higher than 1 indicate up-regulation gene expression, when compared with control group. Statistical differences determined by analysis of variance ( $p \leq 0.05$ ) were identified by different letters (a, b).

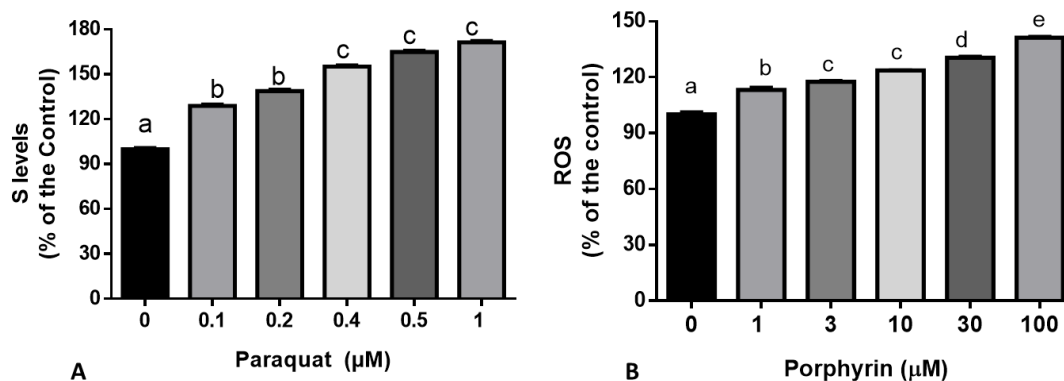
Despite Li exposure trigger GSK-3 $\beta$  down-regulation this effect was dependent of PBMCs genotypes. The Li effects on GSK-3 $\beta$  gene expression was stronger in AA and AV than VV cells, as can see in Figure 3B.

The impact of Val16Ala-SOD2 SNP on GSK-3 $\beta$  protein levels of activated cells Li exposed was also determined. Results showed a more pronounced decrease in GSK-3 $\beta$  levels in A-allele cultures. However, in the VV-PBMCs there was no significant difference between control and Li treatment in relation to enzyme levels. (Figure 4).



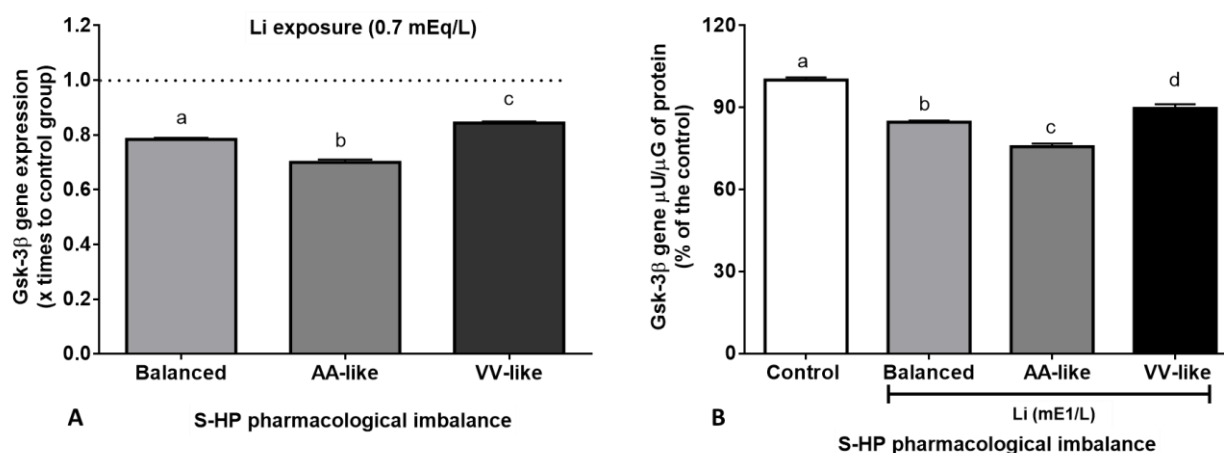
**Figure 4** Comparison of GSK-3 $\beta$  levels protein in PBMCs carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes (AA, AV and VV). Results expressed as percentage of control of the genotype. Analysis were performed in 24 hours cell cultures and compared by Two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. In each cell culture period. Different letters identified statistical differences among GSK-3 $\beta$  among genotypes (a, b).

To perform the second *in vitro* protocol, a S-HP imbalance was established in macrophage cells, using paraquat to generates VV-like and porphyrin to generates AA-like cells (Figure 5). Both S levels (A) porphyrin levels (B) and increased in a concentration-dependent way. From these results we used paraquat at 0.1 $\mu$ M concentration to generates VV-like cells and porphyrin at 1 $\mu$ M concentration to generates AA-like cells.



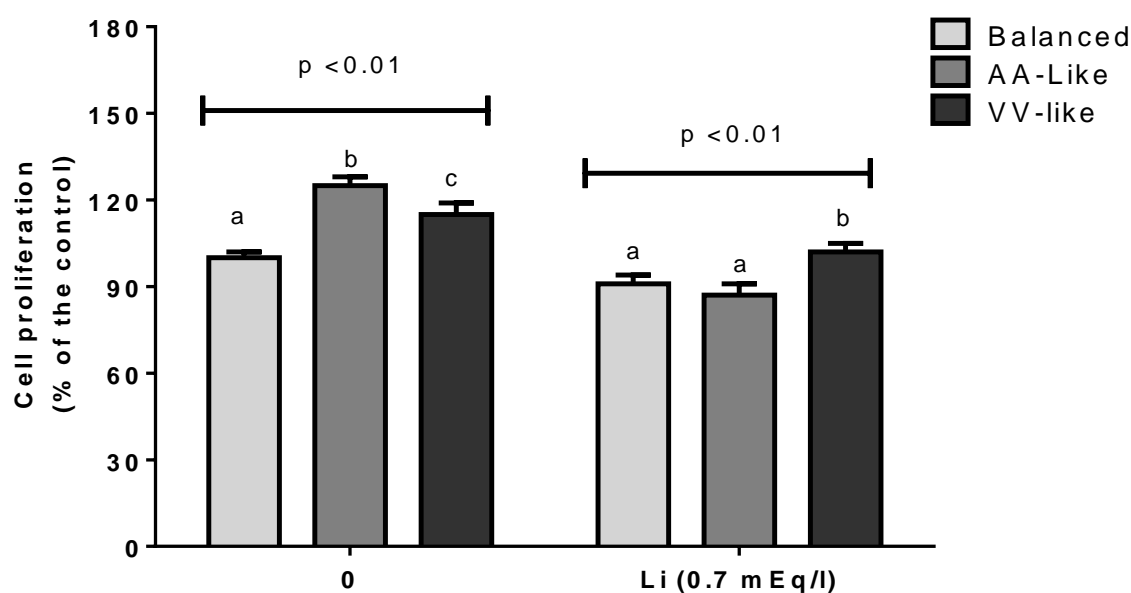
**Figure 5** Effect of different paraquat (A) and porphyrin (B) concentrations on macrophage cell line (24 h cell cultures). The data are presented as % of untreated control group. Statistical comparison was performed by analysis of variance followed by Dunnet's test. Statistical differences  $p \leq 0.01$ . Different letters were used to identify treatments with significant differences at  $p < 0.05$ .

Pharmacological S-HP imbalance on Li effect on GSK-3 $\beta$  gene and protein expression was also determined and results are shown in Figure 5. In relation to activated cells without Li exposure, GSK-3 $\beta$  gene expression was significantly downregulated in all balanced and imbalanced cells (Figure 6A). However, this effect was more pronounced in AA-like cells and less pronounced in VV-like cells than balanced cells. Similar results were observed when GSK-3 $\beta$  protein levels were evaluated (Figure 6B).



**Figure 6** Li effect on Gsk-3 $\beta$  gene (A) and protein (B) expression in RAW macrophage cells S-HP balanced and imbalanced cells. AA-like cells were obtained from porphyrin (1  $\mu$ M) exposure and VV-cells were obtained from paraquat (0,1  $\mu$ M) exposure. Analysis were performed in 24 h cell cultures and compared by analysis of variance. Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ).

Finally, cellular proliferation was evaluated in 72 h cell cultures in order to confirm that culture conditions triggered inflammatory response of RAW macrophages (Figure 7). Data confirmed that PHA induced a proliferative state and Li triggered an anti-inflammatory effect on macrophage cells. However, S-HP imbalance influenced the intensity of the response. AA-like cells presented higher responsivity to PHA exposure than balanced cells, whereas VV-like cells showed an intermediary proliferative rate. However, in the presence of Li, AA-like cells showed similar behaviour of balanced cells, with a decreasing in cellular proliferation. At contrary, VV-like cells presented some resistance in relation to anti-inflammatory Li effects.



**Figure 7:** Comparison among inflammatory response triggered by PHA exposure in 72 h cell cultures of RAW macrophages and Li anti-inflammatory effect considering S-HP imbalance obtained from paraquat (VV-like cells) and porphyrin (AA-like cells) exposure. Balanced cells did not receive any previous oxidative treatment. Treatments were compared by two-way analysis of variance followed by *post hoc* Bonferroni test. Different letters (a, b, c, d) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ .

## Discussion

In the present study, we investigated potential influence of S-HP imbalance on Li anti-inflammatory response by analysis of GSK-3 $\beta$  gene and protein modulation. In fact, S-HP imbalance genetically and pharmacologically triggered had impact on Li-anti-inflammatory effects, which was attenuated in VV- and VV-like cells that present high S basal levels than A-allele and AA-like cells. We consider these results relevant since Li is a first-choice

pharmacological treatment in BP disorders. In fact, Li has been used to treat BD since a long time (about 1960) remaining as the primary mood stabilizing medication.

Prior evidence also showed that Li has important antiinflammatory effect, and currently, it is accepted that this effect occurs by Li capacity to inhibit by GSK-3 $\beta$  enzyme (Nassar and Asab, 2014). Despite these important Li effects, a considerable number of patients do not respond or tolerate Li treatment (Gitlin, 2016) without a known cause, as well as there are several side effects reported that limit the Li use in the BP treatment (Gitlin, 2016). The differential effect of Li in some psychiatric patients suggested the occurrence of some pharmacogenetic influence. However, until now, the main candidate gene studies have included genes involved in the therapeutic action of Li, and in general the results were not replicable (McCarthy et al., 2010; Can et al., 2014; HOU et al., 2016).

Since Li acts via inhibition of GSK-3  $\beta$  and oxidative imbalance affects the inflammatory response, we postulated to be plausible the hypothesis that genetic polymorphisms in the oxidative route could be associated with a differential Li anti-inflammatory response. Prior investigations have suggested that a SNP located in SOD2 gene could affect directly the inflammatory state of cells (Montano et al., 2012; Martin et al., 2012). Complementary studies strongly suggested that S-HP basal state could interfere the cellular response to drugs and bioactive molecules present in some foods depending (Montano et al., 2012; Martin et al., 2012; Barbisan et al., 2014; Capeleto et al., 2015; Duarte et al., 2016).

The relevance of S-HP imbalance on inflammatory modulation was also more deeply studied from an *in vitro* investigation that exposed PBMCs cells carrier's different Val16Ala-SOD2 genotypes to constant PHA activation during 15<sup>th</sup> cell culture passages. This study clarifies the relevance of S-HP imbalance in the inflammatory response, showing that high HP-basal levels found in AA- genotype trigger a more intense and short inflammatory response, whereas high S-basal levels found in VV-genotype sustain for more time an inflammatory state. In fact, VV-inflammatory pattern seems to be similar to chronic inflammatory states associated with some non-transmissible diseases, such as BP disorder (Barbisan et al., 2017).

Considering that human being has great number of SNP genes that could have some influence on cellular S-HP imbalance, a pharmacological S-HP model was designed using murine macrophage cells. Actually, *in vitro* S-HP pharmacological model was previously used by Azzolin et al (2016) and Berto et al (2016) in colorectal and prostate cancer cells, respectively. These authors investigated the role of S-HP imbalance in the cancer proliferative state and its potential influence on chemotherapy resistance. Both studies suggested important influence of S-HP imbalance on cancer cell biology. However, whereas in colorectal cancer

cells high HP levels associated with AA-like phenotype induced high surveillance and proliferative state, in prostate cancer cells a contrary effect of S-HP imbalance was observed. Despite, differences of S-HP effect on different cancer cells, the whole of results reinforcing the relevance of this basal state in cellular biology, and possible in the inflammatory response.

The results described here also suggested that Val16Ala-SOD2 SNP could influence GSK-3 $\beta$  modulation by Li exposure, since AA-cells presented a strong down-regulation of GSK-3 $\beta$  gene and protein when compared to genotypes AV and VV cells. The premise that support this investigation came from prior studies suggesting important effect of Val16Ala-SOD2 on inflammatory metabolism. This effect was initially reported by Montano et al (2012) from an *in vitro* protocol that showed higher levels of proinflammatory cytokines in VV- than AA-PBMC samples. Complementary studies confirmed the role of Val16Ala-SOD2 in the inflammatory response, as described by Duarte et al (2010) when studied inflammatory markers in hypercholesterolemic patient's carrier's different SOD2 genotypes.

In the Duarte's (2016) study VV-subjects also presented higher levels of proinflammatory cytokines, as well as higher levels of oxidative markers than AA-subjects. Subsequently a clinical assay was conducted to test if Val16Ala-SOD2 SNP could to affect the pharmacological response of hypercholesterolemic to rosuvastatin treatment. Results also showed that VV-subjects presented higher proinflammatory cytokines levels and were more resistant to decrease lipid levels in face of rosuvastatin treatment in comparison with A-allele subjects (Duarte et al., 2016). Considering the pharmacogenetic effects of Val16Ala-SOD2 found in Rosuvastatin treatment (Duarte et al., 2016), it could be possible to find similar results in relation to Li treatment. However, different of hypercholesterolemia that patients can well controlled, in terms of lifestyle and pharmacological use of other drugs, BP patients are more difficult to include in pharmacogenetic studies. For this reason, we opted in the present investigation just using an *in vitro* protocols.

Currently, GSK-3 $\beta$  enzyme is recognized as a major regulator of the balance between proinflammatory and antiinflammatory mediators in immune cells, including microglia (Beurel and Jope, 2009). This is ubiquitously expressed and unusually active in resting, non-stimulated cells. In mammals, at least three proteins ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1, and  $\beta$ 2), generated from two different genes, GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ , are widely expressed at both the RNA and protein levels. Despite, control of GSK-3 activity occurs by complex mechanisms that depend on specific signaling pathways (Medina et al., 2011), some inhibitors like Li also are able to induce direct downregulation of GSK-3 $\beta$  gene expression (Mendes et al., 2009). In these terms, investigations of pharmacological modulation of GSK-3 $\beta$  gene expression and protein levels,



could be considered relevant. Moreover, Li exerts anti-inflammatory effects by suppression of other proinflammatory molecules such as interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and enhancement of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (Nassar and Azab, 2014). Some previous investigations also described Li action on Nitric oxide (NO) production as consequence of GSK-3 $\beta$  enzyme inhibition (Yuskastis et al., 2009; Wang et al., 2013).

However, although the relevance of S production during inflammatory process is broadly accepted, prior studies involving GSK-3 $\beta$  enzyme and S and HP modulation are still incipient. In the inflammatory process, the presence of an antigen or injury, high S levels are produced by NAD(P)H oxidases found in all cell types participating in inflammation (leukocytes, endothelial and other vascular cells etc). Concomitantly NO levels also are elevated in activated immune-cells specially macrophages. Both, Superoxide and NO exert its effect on inflammatory response by multiple mechanisms, also inducing high levels of proinflammatory cytokines and a proliferative state of immune macrophages (Guzik et al., 2003).

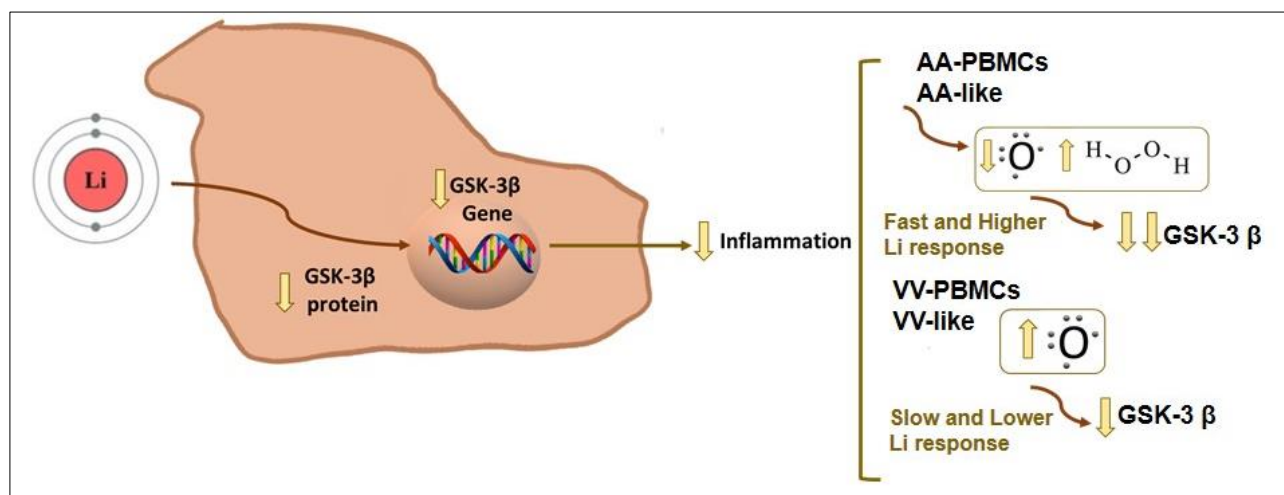
Considering the whole of evidence previously published in the literature about Val16Ala-SOD2 SNP is plausible to accept that AA-cells had an intense response when Li exposed triggering a more effective GSK-3 $\beta$  gene downregulation and level protein, since present highest HP levels and lowest S levels than VV-cells. Moreover, the anti-inflammatory Li effects on AA-PBMCs was confirmed by decreasing in the proliferation rate of 72 hours cell cultures, very similar results were found for the macrophages treated with paraquat and porphyrin in association with Lithium. Cells treated with lithium and porphyrin (AA genotype mimics) presented lower cell proliferation (72 hours) than those treated with paraquat (VV genotype mimic).

At contrary, VV-cells present highest S levels and this fact could cause some delay in the inhibitory Li effect on GSK-3 $\beta$  gene expression and protein level. The Li effects on GSK-3 $\beta$  also could be attenuated by a higher basal S levels. In fact, some authors observed that SOD2 overexpression triggers T-cell activation (Kaminski et al. (2013), and Barbisan et al (2017) showed that AA-PBMCs responded quickly when exposed to phytohemagglutinin (PHA) antigen than VV-PBMCs (Bresciani et al., 2015).

We organized general results found here in a schematic figure (Figure 8) that shows the potential Li and S-HP interaction on inflammatory response of PBMCs cells and macrophage pharmacologically unbalanced, showing that in a cellular environment with low S levels and high HP levels, Li effects on GSK-3 $\beta$  gene modulation, protein levels and inflammatory pattern (evaluated by cell proliferation rate) is fast and more intense. In a cellular environment with

high S levels, Li effects suffer a slower and less intense, and consequently the Li action on general inflammatory pattern evaluated here by cellular proliferation rate is low.

Despite methodological constrains associated with *in vitro* studies, we consider these results relevant is respect to clarification that GSK-3 $\beta$  gene modulation, and level protein is related to S-HP balance of immune cells. And to potential pharmacogenetic effect of Val16Ala-SOD2 on Li responsiveness of BP patients. However, this second issue need to be more clarified by human studies evaluating the relevance of this polymorphism in BP treatment with Li.



**Figure 8** General scheme showing the inhibitory Lithium (LI) effects on GSK-3 $\beta$  gene expression and Protein Level associated with its anti-inflammatory action and potential interaction with Val16Ala-SOD2 SNP homogyzous genotypes (AA and VV) that causes superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immune cells triggering differential Li anti-inflammatory response.

## REFERENCES

- Ajmone-Cat MA, D'Urso MC, di Blasio G, Brignone MS, De Simone R, Minghetti L. Glycogen synthase kinase 3 is part of the molecular machinery regulating the adaptive response to LPS stimulation in microglial cells. *Brain Behav Immun.* 55:225-35, 2016.
- Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, Berto MD, Barbisan F, Dornelles EB, Glanzner WG, Gonçalves PB, Bica CG, da Cruz IB. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol In Vitro.* 32:8-15, 2016.
- Barbisan F, Motta Jde R, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MM, Mostardeiro CP, Unfer TC, Schott KL, da Cruz IB. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One.* 9(10):e107299, 2014.

Barbisan F, Azzolin VF, Ribeiro EE, Duarte MMMF, da Cruz IBM. The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence. *Rejuvenat Res.* 2017 [Epub ahead of print].

Berto MD, Bica CG, de Sá GP, Barbisan F, Azzolin VF, Rogalski F, Duarte MM, da Cruz IB. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. *Med Oncol.* 32(11):251, 2015.

Bresciani G, da Cruz IB, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem.* 68:87-130, 2015.

Can A, Schulze TG, Gould TD. Molecular actions and clinical pharmacogenetics of lithium therapy. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 2014

Capelito D, Barbisan F, Azzolin V, Dornelles EB, Rogalski F, Teixeira CF, Machado AK, Cadoná FC, da Silva T, Duarte T, Duarte MM, da Cruz IB. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. *Biogerontology.* 6(5):621-630, 2015.

Cole AR. Glycogen synthase kinase 3 substrates in mood disorders and schizophrenia. *FEBS J.* 280:5213–5227, 2013.

Czarny P, Wigner P, Galecki P, Sliwinski T. The interplay between inflammation, oxidative stress, DNA damage, DNA repair and mitochondrial dysfunction in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017.

Duarte T, da Cruz IB, Barbisan F, Capelleto D, Moresco RN, Duarte MM. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. *Pharmacogenomics J.* 16(6):501-506, 2016.

Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 54(4):469-487, 2003

Hou. L. et al. Genetic variants associated with response to lithium treatment in bipolar disorder: a genome-wide association study. *Lancet.* 387(10023): 1085–1093, 2016.

Jellusova J, Cato MH, Apgar JR, Ramezani-Rad P, Leung CR, Chen C, Richardson AD, Conner EM, Benschop RJ, Woodgett JR, Rickert RC. Gsk3 is a metabolic checkpoint regulator in B cells. *Nat Immunol.* 18(3):303-312, 2017.

Luca A, Calandra C, Luca M. Gsk3 Signalling and Redox Status in Bipolar Disorder: Evidence from Lithium Efficacy. *Oxid Med Cell Longev.* 3030547, 2016.

McCarthy MJ, Leckband SG, Kelsoe JR. Pharmacogenetics of lithium response in bipolar disorder. *Pharmacogenomics.* 11(10):1439–1465, 2010.

Montano MA, Barrio Lera JP, Gottlieb MG, Schwanke CH, da Rocha MI, Manica-Cattani MF, dos Santos GF, da Cruz IB. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol Cell Biochem.* 328(1-2):33-40, 2009.

Muneer A. Staging models in bipolar disorder: a systematic review of the literature. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 14:117–130, 2016.

Muneer A. Wnt and GSK3 Signaling Pathways in Bipolar Disorder: Clinical and Therapeutic Implications. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 31;15(2):100-114, 2017

Rybakowski JK. Response to lithium in bipolar disorder: clinical and genetic findings. *ACS Chem Neurosci.* 5(6):413-21, 2014.

Schott KL, Assmann CE, Barbisan F, Azzolin VF, Bonadiman B, Duarte MMMF, Machado AK, da Cruz IBM. Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. *Chem Biol Interact.* 273:18-27, 2017.

Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Val16Ala genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenet* 13:145–157, 2003.

#### 4.3 ARTIGO 3

##### **A xanthine-catechin mix intensifies the *in vitro* lithium anti-inflammatory response in activated-macrophages**

Fernanda Barbisan<sup>1</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>1</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>1</sup>, Moisés Henrique Mastella<sup>2</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>3</sup>, Pedro Antonio Schmidt do Prado-Lima<sup>4</sup>, Raquel de Souza Praia<sup>2</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>5</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate program of Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>3</sup> Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

<sup>4</sup> BraIn Institute, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>5</sup> Lutheran University of Brazil, Santa Maria- RS, Brazil

\*Corresponding author:

Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Professor Department of Morphology and Professor Pharmacogenomics and Pharmacogenetics of Postgraduate program of Pharmacology. Health Sciences Center, Campus Santa Maria – Federal University of Santa Maria, Brazil. Avenue Roraima, 1000, building 19, hall 3102, Zip Code 97105-900, Santa Maria- RS, Brazil. Email: [ibmcruz@hotmail.com](mailto:ibmcruz@hotmail.com)

The study was carried out at the Biogenomic Laboratory, Department of Morphology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS-Brazil.

## Abstract

Lithium (Li) is a chemical element used for the treatment and prevention of bipolar disorder (BD) that possesses positive effects, such as anti-inflammatory action, but also undesirable side effects. Because studies that evaluated the interaction between Li and bioactive molecules present in foods are scarce, we investigated the potential interaction between Li and isolated xanthine (caffeine, theobromine) and catechin molecules and a xanthine-catechin mix (XC mix) in RAW 264.7 cells. The effects of treatment on cell proliferation, cell cycle, oxidative and antioxidant markers, and cytokine levels and the gene expression of these cytokines and the GSK-3 $\beta$  enzyme were evaluated. The interaction between Li and XC mix intensified the anti-inflammatory effects of Li, as indicated by decreased levels of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) and increased levels of IL-10 and anti-inflammatory cytokines. However, the effect of Li and XC mix on oxidative metabolism was less pronounced. Despite the controversial nature of caffeine consumption by BD patients, these results suggested that consumption of caffeine, in low concentrations, mixed with other bioactive molecules along with Li may be safe.

**Keywords** Mood stabilizer, bipolar disorder, inflammation, GSK-3 $\beta$  enzyme, oxidative metabolism

## 1. Introduction

Lithium (Li) is a chemical element that occurs naturally in soil and water, mostly at low concentrations, and enters the food chain. Evidence has suggested that low levels of Li have are beneficial to living organisms, whereas high levels are toxic [1]. Li has been used to treat psychiatric illnesses for over 50 years and continues to be a first-line drug used for the treatment and prevention of bipolar disorder (BD) symptoms [2].

In pharmacological terms, unlike conventional drugs that are designed to interact with a specific molecular target, Li presents several effects across many biological processes and biochemical pathways. Despite its recognized efficacy, Li has a low safety profile because of its narrow therapeutic window. For this reason, Li concentrations and clinical signs must be frequently monitored in patients treated with the psychiatric drug [3]

The common side effects of Li include gastrointestinal disturbances, such as nausea and diarrhea; excessive urination and thirst (polyuria and polydipsia); tremor, primarily of the hands; weight gain; cognitive impairment; and sexual dysfunction, primarily in men. Progressive renal insufficiency, a complication of long-term lithium therapy, is a serious and potentially fatal side effect [2,3].

A review by Glitlin discussed the primary therapeutic strategies used to manage Li side effects. These include the use of diuretics to treat polyuria; the use of beta-blockers, primidone, benzodiazepines, or vitamin B6 to treat tremor; exercise and caloric-restriction to avoid weight

gain; the use of stimulants to manage cognitive impairment; and the use of aspirin or phosphodiesterase 5-inhibitors to treat sexual dysfunction [3].

Even though Li helps control BD symptoms, it is also a potentially dangerous drug and the bioactive molecules present in common foods may help decrease some of the side effects of Li. Guaraná (*Paullinia cupana*), an Amazonian plant that has been consumed since Pre-Columbian times, has some properties that could help decrease the intensity of Li side effects, including diuretic, thermogenic, energetic, and anti-obesogenic effects. Prior investigations also indicated that guaraná was neuroprotective, improved cognitive function and memory, and possessed antidepressant properties [4-9]. Moreover, studies indicated that guaraná had an anti-inflammatory effect that could potentiate that of Li [10-11]. In chemical terms, guaraná is a chemical matrix compound consisting mainly of xanthines (e.g., caffeine and theobromine/theophylline) and catechins. This general chemical matrix is also found in coffee and tea (green or black) [12].

Despite the functional effects of guaraná on several biological metabolisms, the content of plant extracts can vary and affect the end result. For this reason, studies evaluating the primary chemical matrix of these extracts are relevant and studies involving the potential interaction between xanthine-caffeine (XC) and Li may be useful for evaluating the ability of extracts to attenuate the undesirable side effects or potentiate the beneficial action of Li. For this reason, we performed an *in vitro* analysis in RAW 264.7 macrophages to evaluate the potential interaction between Li and the primary XC bioactive molecules and the effects on the oxidative and inflammatory response using guaraná as a reference chemical matrix.

## 2. Methods

### 2.1 Experimental design

We performed an *in vitro* study using commercial murine RAW 264.7 macrophages, a commercial cell line obtained from American Type Culture Collection (ATCC- Manassas-USA). This experimental model was chosen based on the following three considerations. (1) There is evidence that human genetic polymorphisms directly affect the inflammation in human peripheral blood mononuclear cells. This is the case for Val16Ala-SOD2 single nucleotide polymorphism (rs4880) found in superoxide dismutase manganese-dependent enzymes that are associated with differential oxidative-inflammatory responses to drugs and bioactive molecules present in foods [13-19]. (2) We chose to study the effect of the Li and XC interaction on

activated-macrophages because a number of studies have consistently suggested that psychiatric disorders, such as BD, are associated with chronic inflammatory conditions [20].

(3) Oxidative stress and inflammatory triggering are two factors associated with the toxic effect of pharmacological or environmental agents.

The potential interaction between Li and XC molecules (LXC mix) was evaluated in macrophages by evaluating the effects on cellular proliferation, cell cycle, modulation of oxidative markers [reactive oxygen species (ROS), superoxide anion (SA), and nitric oxide (NO)], DNA damage, and inflammatory cytokines [interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), and IL-10]. The effect on cytokine and glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) enzyme gene expression was also evaluated. We used phytohemagglutinin (PHA), an antigen that triggers inflammation in macrophages, as a positive control. All experiments were performed in triplicate.

## *2.2 Cell culture and treatments*

Macrophages were cultured as previously described by da Cruz Jung [21] using DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 mg/mL). Cultures were maintained in standardized and controlled incubator conditions at a temperature of 37°C with humidity and CO<sub>2</sub> at 5%. All protocols were replicated at least three times. Macrophage cells were exposed to the following concentrations of each molecule: Li, (0, 17-0, 35-0, 70-1, 40-2, 80 ME/L); caffeine, (25, 50, 100, 200, and 400  $\mu$ g/mL); theobromine, (25, 50, 100, 200, and 400  $\mu$ g/mL); and catechin, (25, 50, 100, 200, and 400  $\mu$ g/mL).

All experiments were performed using Li, caffeine, theobromine, and catechin. Purified molecules were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

## *2.3 Cellular proliferation assays*

All analyses involving the measurement of absorbance or fluorescence were performed using a SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). Cell proliferation was determined with a MTT (3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction spectrophotometric assay, as previously described by Barbisan et al [19]. Briefly, MTT was dissolved in 5 mg/mL phosphate buffered saline (PBS) and added to a 96-well plate containing the sample treatments. The plate was incubated for 1 h

at 37°C. Supernatant was then removed from the wells and the cells were resuspended in 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO). The absorbance was read by spectrophotometry at 560 nm.

The effect of the interaction between Li and XC on the cell cycle was evaluated using flow cytometry after cell cultures were exposed to propidium iodide (PI) dye for 72 h, using a protocol similar to that described by Azzolin et al [22]. In our work, cells were seeded in 6-well plates at  $5 \times 10^4$  cells per well with 2 mL of the different treatments in DMEM and were incubated for 24 and 72 h. After incubation, the cells were trypsinized, washed with PBS, and resuspended in 70% ethanol. Thereafter, cells were stored at  $-20^\circ\text{C}$  overnight. Prior to analysis, the cells were centrifuged and washed once with PBS, then resuspended in 500 µL PI solution in PBS consisting of 50 µg/mL PI from  $50 \times$  stock solution (2.5 mg/mL), 0.1 mg/mL RNase A, and 0.05% Triton X-100. The cells were incubated for 40 min at 37°C, 3 mL of PBS was added for washing, and the cells were resuspended in 500 µL PBS for flow analysis.

#### *2.4 Quantification of oxidative markers and antioxidant enzymes*

The quantification of NO, SA, and ROS was performed and compared among treatments using a protocol similar to that described by Costa et al [23]. ROS production was determined using a 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) fluorometric assay. DCFH-DA (Sigma-Aldrich-D6883; St. Louis, MO, USA) is a nonfluorescent compound that is deacetylated by mitochondrial esterase enzymes to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). DCF, which reacts with ROS molecules and becomes DCF, a fluorescent compound. Fluorescence was measured at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 525 nm.

Because NO is considered a crucial molecule in the inflammatory response, this molecule was quantified with a colorimetric assay used to detect organic nitrate [13]. The absorbance was read at a wavelength of 540 nm. SA was measured as described by Morabito et al [24] at 560 nm.

Analysis of treatment effects on the modulation of the endogenous antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) was performed using commercial kits specific to each enzyme (Sigma Aldrich) following the manufacturer's instructions.

#### *2.5 Quantification of cytokines*



The levels of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , and IL-10) in the cell culture supernatants were measured using a Quantikine Human Kit (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) according to the manufacturer's instructions. The protocol was similar to that described by da Cruz Jung et al [21]. All reagents and working standards were prepared and the excess microplate strips were removed before adding 50  $\mu$ L of the assay diluent, RD1W, to each well. Thereafter, 100  $\mu$ L of standard control for the samples was added to each well and the wells were covered with adhesive strips and incubated for 1.5 h at 25 degrees Celsius temperature. Each well was subsequently aspirated and washed twice, for a total of three washes. The antiserum of each molecule analyzed was added to each well and the wells were covered with new adhesive strips before being incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated and the conjugate (100  $\mu$ L) was added to each well and the plate was incubated for 30 min at room temperature. The aspiration/wash step was repeated again before adding 100  $\mu$ L of substrate solution to each well, followed by incubation at room temperature for an additional 20 min. The assay was finalized when 50  $\mu$ L of stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm.

### *2.6 Cytokine and GSK3 enzyme gene expression modulation*

Gene expression was determined using quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis with a Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN Biotechnology, Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany). Total RNA after each treatment was extracted using Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and most genes were quantified as previously described by Jung et al [28]. To perform reverse transcription, RNA was added to the samples (1000 ng/ $\mu$ L) with 0.2  $\mu$ L of DNAase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA) at 37°C for 5 min, followed by heating at 65°C for 10 min. cDNA was generated with 1  $\mu$ L of iscript cDNA and 4  $\mu$ L of Mix iscript (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) under the following reaction conditions: 5°C for 10 min, 25°C for 5 min, 85°C for 5 min, and 5°C for 60 min.

qRT-PCR was conducted under the following reaction conditions: 95°C for 3 min, 40 cycles of 95°C for 10 s and 60°C for 30 s, followed by a melt curve of 60°C to 90°C in 0.5°C increments for 5 s. The qRT-PCR reactions of each sample were made in triplicate, using 1  $\mu$ M of each primer, 1000 ng/ $\mu$ L of cDNA, RNAase-free water, and 2 $\times$  QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (QIAGEN Biotechnology, Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany) in a

final volume of 20  $\mu$ L. The beta-actin gene was used as a housekeeping gene. Relative expression was calculated using the comparative cytosine-thymine (CT) and was expressed as the fold expression compared to the control.

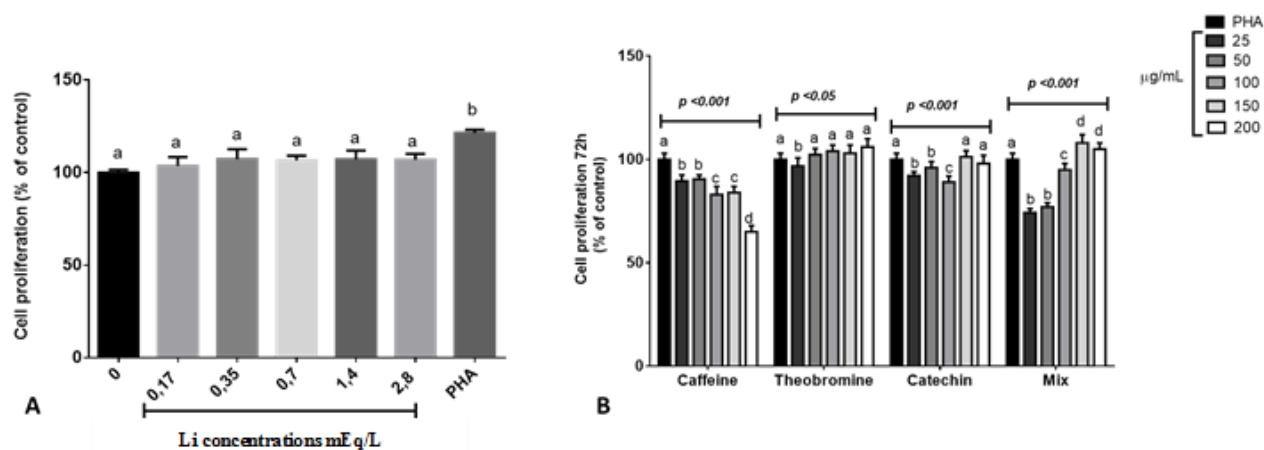
The specific primer pairs of cytokines used in this study were: IL-1 $\beta$  forward: 5'-GCGGCATCCAGCTACGAAT-3' and reverse: 5'- ACC AGCATCTTCCTCAGCTTGT-3'; IL-6: forward: 5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCCA-3' and reverse : 5'-CCGTCGAGGATGTACCGAATT-3' ; TNF- $\alpha$ : forward: 5'- CAA CGGCATGGATCTCAAAGAC-3' and reverse: 5'-TATGGGCTCATAACCAGGGTTTG-3'; IL-10: 5'- forward GTGATGCCCAAGCTGAGA-3' and reverse: 5'- TGCTCTTG TTTTCACAGGGAAGA-3', and primer pairs of GSK3- $\beta$  forward: 5'-CTCTGGCCACCATCCTTATC -3' and reverse: 5'-CACGGTCTCCAGCATTAGTATC-3', and housekeeping  $\beta$ -actin forward: 5'- TGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3' and reverse: 5'-TGCGCAAGTTAGGTTTTGTCA-3'.

### 2.7 Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., Brazil). All results were calculated as % of the negative control group and expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The results of treatments were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey or Bonferroni *post hoc* test, according to the case. A result of  $p < 0.05$  was considered significant.

## 3. Results

Initially, the effect of Li, isolated XC molecules, and an XC mix on macrophage proliferation in 72 h cell cultures was analyzed (Figure 1). Li did not affect cellular proliferation, but XC molecules heterogeneously altered macrophage proliferation. Caffeine significantly decreased the proliferative ratio in a dose-dependent manner.

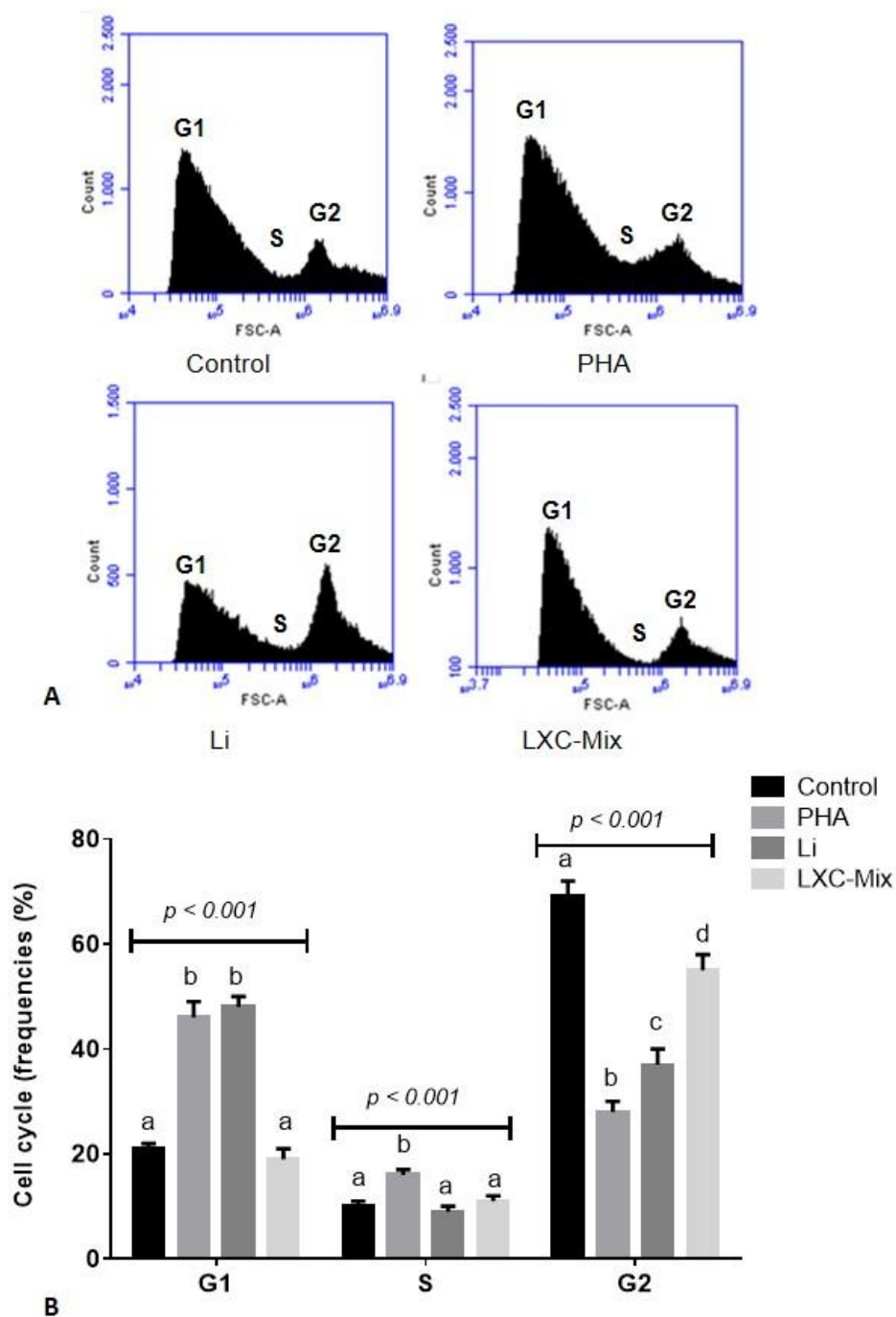


**Figure 1** Curve concentrations of Lithium (Li), isolated xanthine-catechin (XC) molecules, and XC mix on macrophage cellular proliferation in 72 h cell cultures. Li concentrations were analyzed by one-way analysis of variance followed by the Tukey *post hoc* test. XC molecule concentrations were analyzed by two-way analysis of variance followed by the Bonferroni *post hoc* test. The different letters (a, b, c...) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ .

The Treatment with xanthine did not change cellular proliferation, except at a lower concentration (25 µg/mL). Treatment with catechin resulted in decreased cellular proliferation at lower concentrations (25 to 100 µg/mL), but cellular proliferation remained similar to the control group at concentrations > 100 µg/mL. The effect of the XC mix on cellular proliferation was less at lower concentrations, similar to that observed in cells exposed to catechin. However, the proliferative ratio was higher after treatment with XC mix concentrations > 100 µg/mL compared to the control group.

Considering that the lower concentration (25 µg/mL) of isolated XC molecules was represented in the 25 µg/mL concentration of XC mix, the following experiments evaluated the interaction between Li at 0.7 MEq/L, an estimated therapeutic concentration, and XC mix at a concentration of 25 µg/mL.

Evaluation of the cell cycle in macrophage 72 h cell cultures was directly affected by exposure to PHA, Li, and XC mix (Figure 2). The frequency of G1 and S was significantly higher in PHA-activated macrophages than in the control cells. The higher G1 frequency in PHA-activated cells could be explained because in flow cytometry, this phase also includes the G0 cells that were recently produced by mitosis.

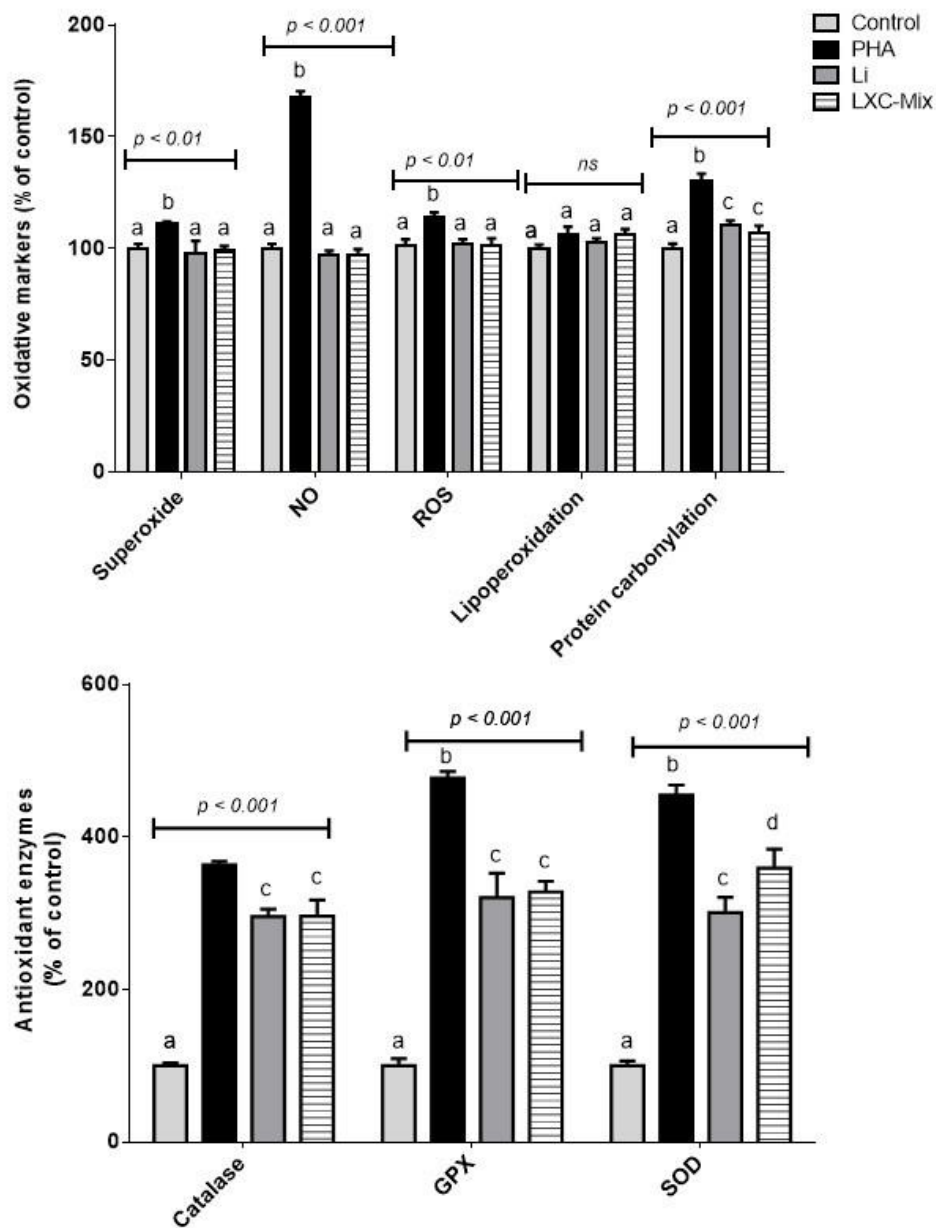


**Figure 2** Cell cycle comparison among activated-macrophages (PHA = phytohemagglutinin), Li, xanthine-catechin (XC) mix, and Li and XC (LXC mix) exposed in 72 h cell cultures. Statistical analysis was performed by two-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. The different letters (a, b, c...) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ .

The G2 frequency was lower in PHA-activated macrophages than control macrophages. The G1 frequency in Li-activated cells was similar to that in PHA-activated cells, but the S frequency was similar to that in control macrophages. The G2 frequency in Li-activated cells was between that of control and PHA-exposed cells.

In the presence of LXC mix, the G1 and S frequencies were similar to those of the control group, whereas the G2 frequency was higher than that in PHA- and Li-activated cells, but lower than that in the control group. Overall, activated macrophages exposed to LXC mix presented a cell cycle similar to that observed in control cells.

Modulation of oxidative metabolism in PHA-activated macrophages with and without Li and LXC mix supplementation was determined and the primary results are presented in Figure 3. SA, NO, and ROS concentrations were higher in PHA-activated macrophages than those in the control group. However, exposure to Li and LXC mix did not result in any change in the levels of these oxidative markers compared to those in control cells. Lipoperoxidation was not changed in treated cells compared to untreated control cells. Conversely, protein carbonylation was higher in PHA-activated cells than in control cells and exposure to Li and LXC mix resulted in levels of these oxidative markers between those of control and PHA-activated cells. Antioxidant enzyme levels were higher in PHA-activated cells than control cells. Even though Li and LXC mix supplementation resulted in a significant increase in antioxidant enzymes, this effect was attenuated compared with PHA-activated cells.

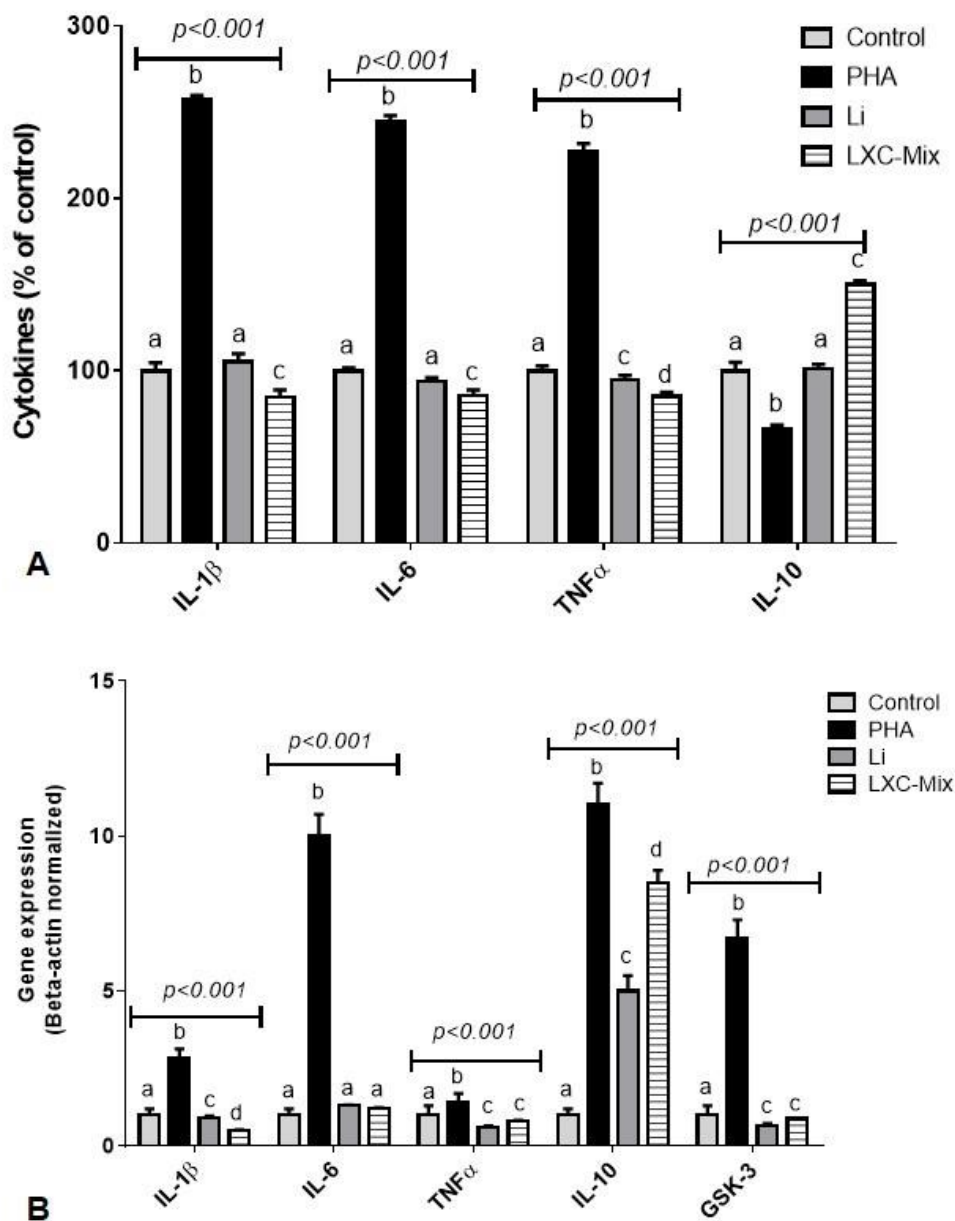


**Figure 3** Comparison of oxidative metabolism markers among activated-macrophages [(PHA = phytohemagglutinin), Li, xanthine-catechin (XC) mix, and Li and XC (LXC) mix] after 72 h of exposure. NO = nitric oxide; ROS = reactive oxygen species; GPX = glutathione peroxidase; SOD = superoxide dismutase. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance followed by the Bonferroni *post hoc* test. The different letters (a, b, c...) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ .

Modulation of cytokine levels and gene expression of cytokines and GSK-3 $\beta$  enzyme were also investigated (Figure 4). As expected PHA-activated macrophages had higher levels and

up-regulation of the proinflammatory cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$ , and the GSK-3 enzyme. Lower IL-10 levels were observed in PHA-macrophages compared to control cells. However, its gene was up-regulated in PHA-activated cells. Li-activated macrophages had similar IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-10 levels than control cells.

However, TNF- $\alpha$  levels in Li-activated macrophages were lower than those in control cells. Li exposure triggered downregulation of all proinflammatory cytokine genes, as well as GSK-3 genes, compared with those in control cells. The interaction between Li and XC mix resulted in a decrease in all proinflammatory cytokine levels and triggered higher IL-10 levels. Gene modulation after LXC mix exposure was also observed and occurred by down-regulation of all proinflammatory genes and the GSK-3 gene and up-regulation of the IL-10 gene compared to the control group.



**Figure 4** Comparison among activated-macrophages [(PHA = phytohemagglutinin), Li, xanthine-catechin (XC) mix, Li and XC (LXC) mix] after 72 h of exposure of: (A) cytokine levels; (B) gene expression of cytokines and GSK-3 gene. All samples were normalized using the  $\beta$ -actin housekeeping gene and results are indicated as folds of the control group. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance followed by the Bonferroni *post hoc* test. The different letters (a, b, c...) indicate statistical differences in each treatment at  $p < 0.05$ .



#### 4. Discussion

In the present investigation, we studied the effects of the potential interaction between Li and an XC mix based on the guaraná plant in macrophage oxidative and inflammatory responses. In general, the results indicated an active interaction among these molecules, but this interaction intensified the anti-inflammatory effects of Li previously described in the literature [25]. In this study, we confirmed this effect by the lowering action of Li on GSK-3 that has been previously described in the literature and was observed when macrophages were treated with Li [26,27,28].

Conversely, the effects of LXC mix on oxidative metabolism were not as pronounced as its anti-inflammatory action. We also initially evaluated the effects of isolated caffeine, theobromine, and catechin on macrophage cellular proliferation. However, the effects of the isolated molecules were not potent enough to justify additional investigation. Moreover, in nature, caffeinated beverages, such as coffee, green and black tea, yerba mate, and guarana, generally contain several catechin molecules, not only caffeine [29,30,31].

Many investigations have suggested that innate immune system dysfunction may play a role in the pathophysiology of BD, the symptoms of which are generally controlled by Li administration. As such, high proinflammatory cytokine levels have been identified in BD patients and the innate immune system is considered a novel therapeutic target in BD. This indicates that Li exerts important anti-inflammatory effects in BD patients [32]. Surprisingly, other chronic degenerative diseases that XC beverage consumption has been positively associated with [33-35] include neurodegenerative morbidities, such as Parkinson's and Alzheimer's disease [36]. However, investigations related to psychiatric disorders are scarcer and have conflicting data.

Gomez-Pinilla and Nguyen [37] commented that polyphenols, including catechins, found in plants can affect a broad range of mechanisms in the brain and help in the maintenance of cognition and mental health. Therefore, the consumption of diets enriched with polyphenols could be an inexpensive therapeutic option in psychiatric patients. Conversely, evidence has indicated that high caffeine consumption is associated with several psychiatric manifestations in patients with mood and psychotic symptoms [38,39]. Therefore, caffeine intake by these patients should be assessed carefully in clinical practice. In fact, excessive coffee consumption may exacerbate BD, including by affecting Li blood concentrations [38].

Caffeine is the most consumed psychostimulant in the world and acts as a nonselective adenosine receptor agonist. Studies have suggested that caffeine acts on the microglia-mediated neuroinflammatory response associated with many neurodegenerative conditions [39]. A prior investigation also indicated that caffeine prevented the inflammatory response in RAW 264.7 LPS-exposed macrophages. In the present investigation, XC mix intensified the anti-inflammatory response when macrophages were concomitantly exposed to this mixture and Li, but caffeine concentration was relatively low. With respect to theobromine and catechin molecules, we can suggest the negative effects of caffeine in psychiatric patients could be related to the quantity of daily caffeinated beverage intake and to the chemical matrix of these beverages. For example, studies, such as that performed by Ryung et al [40], indicated that caffeine intake from 200 to 4600 mg/day triggered psychotic events. However, doses lower than 200 mg/day could be safe.

## 5. Conclusion

Despite the methodological constraints of *in vitro* studies, the results described here indicated that the interaction between Li and low concentrations of XC mix compounds found in dietary beverages intensified the anti-inflammatory response in macrophages. These results are useful for BD and other psychiatric patients because consumption of beverages containing caffeine, theobromine, and catechins, such as coffee, green and black tea, yerba mate, and guarana, is part of the routine dietary pattern of a large number of people in the world.

## Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

We are grateful to the Biogenomic Laboratory research team that helped us with some experimental protocols. The study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and CAPES with grants and fellowships.

## References

- 1-Shahzad B, Mughal MN, Tanveer M, Gupta D, Abbas G. Is lithium biologically an important or toxic element to living organisms? An overview. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017; 24(1):103-115.
- 2-Finley PR. Drug interactions with lithium: An update. *Clin Pharmacokinet* 2016; 55(8):925-941.
- 3-Gitlin M. Lithium side effects and toxicity: prevalence and management strategies. *Int J Bipolar Disord* 2016; 4(1):27.
- 4- Mingori MR, Heimfarth L, Ferreira CF, Gomes HM, Moresco KS, Delgado J, Roncato S, Zeidán-Chuliá F, Gelain DP, Moreira JC. Effect of *Paullinia cupana* Mart. commercial extract during the aging of middle age Wistar rats: Differential effects on the hippocampus and striatum. *Neurochem Res* 2017.
- 5- Ruchel JB, Braun JB, Adefegha SA, Guedes Manzoni A, Abdalla FH, de Oliveira JS, Trelles K, Signor C, Lopes ST, da Silva CB, Castilhos LG, Rubin MA, Leal DB. Guarana (*Paullinia cupana*) ameliorates memory impairment and modulates acetylcholinesterase activity in Poloxamer-407-induced hyperlipidemia in rat brain. *Physiol Behav* 2017;168:11-19.
- 6- Pomportes L, Davranche K, Brisswalter I, Hays A, Brisswalter J. Heart rate variability and cognitive function following a multi-vitamin and mineral supplementation with added guarana (*Paullinia cupana*). *Nutrients* 2014; 7(1):196-208.
- 7- Scholey A, Bauer I, Neale C, Savage K, Camfield D, White D, Maggini S, Pipingas A, Stough C, Hughes M. Acute effects of different multivitamin mineral preparations with and without Guaraná on mood, cognitive performance and functional brain activation. *Nutrients*; 5(9):3589-3604.
- 8- Kennedy DO, Haskell CF, Robertson B, Reay J, Brewster-Maund C, Luedemann J, Maggini S, Ruf M, Zangara A, Scholey AB. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). *Appetite* 2008; 50(2-3):506-513.
- 9- Otobone FJ, Sanches AC, Nagaie R, Martins JV, Sela VR, de Mello JC, Audi EA. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Res* 2007; 21(6):531-535.
- 10- da Costa Krewer C, Suleiman L, Medeiros Frescura Duarte MM, Ribeiro EE, Mostardeiro CP, Montano MAE, de Ugalde Marques da Rocha MI, Algarve TD, Bresciani G, Mânica da Cruz IB. Guaraná, a supplement rich in caffeine and catechin, modulates cytokines: evidence from human in vitro and in vivo protocols. *Eur Food Res Tech* 2014; 239(1):49-57.

11- Suleiman L, Barbisan F, Ribeiro EE, Moresco RN, Bochi G, Marta Duate MMF, Antunes KT, Manica-Cattani MF, Unfer TC, Azzolin VF, Griner J, Da Cruz IBM. Guaraná supplementation modulates triglycerides and some metabolic blood biomarkers in overweight subjects. *Ann Obes Disord* 2016;1(1):1004.

12- Angelo PC, Nunes-Silva CG, Brígido MM, Azevedo JS, Assunção EN, Sousa AR, Patrício FJ, Rego MM, Peixoto JC, Oliveira WP Jr, Freitas DV, Almeida ER, Viana AM, Souza AF, Andrade EV, Acosta PO, Batista JS, Walter ME, Leomil L, Anjos DA, Coimbra RC, Barbosa MH, Honda E, Pereira SS, Silva A, Pereira JO, Silva ML, Marins M, Holanda FJ, Abreu RM, Pando SC, Gonçalves JF, Carvalho ML, Leal-Mesquita ER, da Silveira MA, Batista WC, Atroch AL, França SC, Porto JI, Schneider MP, Astolfi-Filho S; Brazilian Amazon Consortium for Genomic Research (REALGENE). Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Rep* 2008;27(1):117-124.

13- Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res* 2013;47(10):781-792.

14- dos Santos Montagner GF, Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MM, da Cruz IB. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol In Vitro* 2010;24(5):1410-1416.

15- Barbisan F, Motta Jde R, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MM, Mostardeiro CP, Unfer TC, Schott KL, da Cruz IB. Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One*. 2014; 20;9(10):e107299.

16- Algarve TD, Barbisan F, Ribeiro EE, Duarte MM, Mânica-Cattani MF, Mostardeiro CP, Lenz AF, da Cruz IB. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. *Genet Mol Res* 2013;12(4):5134-5144.

17- Dornelles EB, Goncalves BD, Schott KL, Barbisan F, Unfer Tc, Glanzner WG, Machado AK, Cadona FC, Azzolin VF, Montano MA, Griner J, da Cruz IBM. Cytotoxic effects of moderate static magnetic field exposure on human periphery blood mononuclear cells are influenced by Val16Ala-MnSOD gene polymorphism. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017;24(5):5078-5088.

18- Schott KL, Assmann CE, Barbisan F, Azzolin VF, Bonadiman B, Duarte MMMF, Machado AK, da Cruz IBM. Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. *Chem Biol Interact* 2017;273:18-27.

19- Barbisan F, Azzolin VF, Ribeiro EE, Duarte MMMF, da Cruz IBM. The in vitro influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence. *Rejuvenation Res*. 2017.

- 20- Sayana P, Colpo GD, Simões LR, Giridharan VV, Teixeira AL, Quevedo J, Barichello T. A systematic review of evidence for the role of inflammatory biomarkers in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2017;92:160-182.
- 21- da Cruz Jung IE, Machado AK, da Cruz IB, Barbisan F, Azzolin VF, Duarte T, Duarte MM, do Prado-Lima PA, Bochi GV, Scola G, Moresco RN. Haloperidol and risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. *Psychopharmacol (Berl)* 2016; 233(9):1715-1723.
- 22- Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, Berto MD, Barbisan F, Dornelles EB, Glanzner WG, Gonçalves PB, Bica CG, da Cruz IB. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol In Vitro* 2016;32:8-15.
- 23- Costa F, Dornelles E, Mânica-Cattani MF, Algarve TD, Souza Filho OC, Sagrillo MR, Garcia LF, Cruz IB. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphen citrate in oxidative metabolism. *Reprod Biomed Online.* 2012 ;24(4):474-481.
- 24- Morabito C, Rovetta F, Bizzarri M, Mazzoleni G, Fanò G, Mariggì MA. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic Biol Med* 2010;48(4):579-589.
- 25- Rosenblat JD, McIntyre RS. Bipolar disorder and inflammation. *Psychiatr Clin North Am* 2016;39 (1):125-137.
- 26- Chiu CT, Wang Z, Hunsberger JG, Chuang D. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev* 2013; 65(1):105-142.
- 27- Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat Immunol* 2005 ;6(8):777-784.
- 28- Luca A, Calandra C, Luca M. Gsk3 signalling and redox status in bipolar disorder: Evidence from lithium efficacy. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 3030547.
- 29- Wang Y, Ho CT. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J Agric Food Chem* 2009;57(18):8109-8114.
- 30- Chandra S, De Mejia Gonzalez E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Agric Food Chem.* 2004 Jun 2;52(11):3583.
- 31- Marques LL, Panizzon GP, Aguiar BA, Simionato AS, Cardozo-Filho L, Andrade G, de Oliveira AG, Guedes TA, Mello JC. Guaraná (*Paullinia cupana*) seeds: Selective supercritical extraction of phenolic compounds. *Food Chem* 2016;212:703-711.

- 32- Sayuri Yamagata A, Brietzke E, Rosenblat JD, Kakar R, McIntyre RS. Medical comorbidity in bipolar disorder: The link with metabolic-inflammatory systems. *J Affect Disord* 2017;211: 99-106.
- 33- Yang CS, Lambert JD, Ju J, Lu G, Sang S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224(3):265-273.
- 34- Hursel R, Westerterp-Plantenga MS. Catechin- and caffeine-rich teas for control of body weight in humans. *Am J Clin Nutr* 2013; 98(6 Suppl):1682S-1693S.
- 35- Türközü D, Tek NA. A minireview of effects of green tea on energy expenditure. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57 (2):254-258.
- 36- Kolahdouzan M, Hamadeh M. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther* 2017;23(4):272-290.
- 37- Gomez-Pinilla F, Nguyen TT. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutr Neurosci* 2012;15(3):127-133.
- 38- Mester R, Toren P, Mizrachi I, Wolmer L, Karni N, Weizman A. Caffeine withdrawal increases lithium blood levels. *Biol Psychiatry* 1995; 37(5):348-350.
- 39- Wang HR, Woo YS, Bahk WM. Caffeine-induced psychiatric manifestations: a review. *Int Clin Psychopharmacol* 2015;30(4):179-182.
- 40- Ryung WH, Young SW, Won-Myong B. Caffeine-induced psychiatric manifestations: A review. *Int Clin Psychopharmacol* 2015;30(4):179-182.

## 4.4 ARTIGO 4

**Lithium anti-inflammatory effects is differentially modulated by interaction with antidepressant drugs determined by an inflammatory ratio analysis**

Fernanda Barbisan<sup>1</sup>, Pedro Antônio Schmidt do Prado-Lima<sup>2#</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>3</sup>, Cibele Ferreira Teixeira<sup>4</sup>, Dianni Capeleto<sup>5</sup>, Gustavo Cardenas Monteiro<sup>6</sup>, Ivo Emílio da Cruz Jung<sup>7</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>8</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>9</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>10\*</sup>

<sup>1</sup>MSc, Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup>PhD, BraIn Institute, Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>3</sup>MSc, Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>4</sup>MSc, Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>5</sup>MSc, Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>6</sup>MD, Biogenomic Laboratory, Morphology Department, Health Science Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>7</sup>MSc, Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>8</sup>PhD, Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

<sup>9</sup>PhD, Lutheran University of Brazil, Santa Maria- RS, Brazil

<sup>10</sup>PhD, Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

# This author contributed equally with the first author in this manuscript

\* Corresponding author. Av Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria -RS, Brazil. ZipCode 97105900. Phone: +55-55-32208163, email: ibmcruz@hotmail.com

## ABSTRACT

Lithium (Li), a mood stabilizer has anti-inflammatory effect. However, in clinical practice, LI can be administered together other antidepressants drugs, such as fluoxetine (FLX), imipramine (IMI), nortriptyline (NOR) and escitalopram (ESC). As interaction between Li and these antidepressant drugs on inflammatory modulation was not investigated yet, we performed an *in vitro* protocol using a non-human macrophage cell line (RAW 264.7). Oxidative and inflammatory markers, as well as cell cycle analysis and cytokine gene expressions were compared among treatments. An inflammatory ratio (IR) was calculated based follow oxidative-inflammatory variables: nitric oxide, superoxide anion, reactive oxygen molecules, cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10, an anti-inflammatory cytokine. The IR calculated from *in vitro* data, was validated by a complementary *in vivo* analysis where similar IR using databank information's of 154 human subjects. LI and control cells presented similar IR values. FLX, NOR and IMI increased slightly IR values indicating some proinflammatory effect, whereas ESC decreased IR values indicating some anti-inflammatory effect. However, Li + ESC exposed triggered a proinflammatory response on macrophages. In conclusion, results compared by IR values, a novel analytic approach of inflammatory parameters suggest that LI anti-inflammatory effect is not universal and could be influenced by basal macrophage-inflammatory state and by the interaction of other psychiatric drugs. These results could be useful to understand some inconsistencies observed in human studies involving LI and other psychiatric drugs.

**Key-words:** mood disorders, inflammation, selective serotonin reuptake inhibitors, bipolar disorder, lithium

## Introduction

Lithium (Li) is used to treat bipolar disorder for decades and remains the gold standard in the treatment of this psychiatric disease, presenting efficacy to control manic and depressive symptoms and also to prevent recurrence of mood alterations and suicide risk (Marmol, 2008; Holder, 2017; Freeland et al., 2017). Studies also reported that Li treatment could reduce prevalence of some neurological and cardiovascular morbidities, including myocardial infarction (Prosser and Fiever, 2016; Decker and Muñoz-Torrero, 2016; Guttuso et al., 2017).

Despite the exact biochemical mechanism by which Li exerts mood stabilization it is not totally elucidated. A potential causal action of Li on bipolar disorder could involve effect on neurotransmitter signalling, adenylyl cyclase system, signalling on inositol phosphate and protein kinase, metabolism of arachidonic acid (Marmol et al., 2008) and also in inflammatory metabolism (Ayorech et al., 2015).



In fact, some psychiatric diseases, including bipolar disorder have been associated with chronic neuroinflammation status with increase of proinflammatory cytokines levels in blood peripheral circulation (Chang et al., 2017; Sayana et al., 2017). Li seems to present anti-inflammatory effect by inhibition of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), that when is hyperactivated contributes to establish chronic inflammation patterns (Luca et al., 2016; Muneer, 2017), and also reducing significantly some proinflammatory cytokines such as interleukin IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  produced by macrophages, neutrophils and/or dendritic cells (Van der Ameele et al, 2016). However, whether Li anti-inflammatory effects has some influence of other environmental and pharmacological factors is an open question.

In clinical practice, Li is often added to antidepressants drugs, mainly as strategy to treat refractory depression and to accelerate antidepressant response of some drugs such as fluoxetine (FLX), imipramine (IMI), nortriptyline (NOR) and escitalopram (ESC) (Zullino and Baumann, 2001; Nierenberg et al., 2003; Freemantle et al., 2007; Edwards et al., 2013; Saini et al., 2016).

However, there are some controversial results about Li beneficial effects by inflammatory modulation (Ayorech et al., 2015), and we cannot exclude that controversies could associated with potential intervenient variables that could interfere in the results or in their interpretation, such as genetic factors that act on inflammatory modulation (Bresciani et al., 2013; 2015; Barbisan et al., 2017).

Inconsistences between *in vitro* and *in vitro* or *in vitro* and *in vivo* data previously published in the literature also could be associated with the fact that inflammatory metabolism involves a dynamic cascade of events orchestrated by several self-related proinflammatory and anti-inflammatory molecules. Therefore, some drugs could trigger temporal changing in inflammatory cascade, but the final result to be similar making it difficult to interpret data. In some studies, particularly *in vitro* protocols that are not other inflammatory markers to use as reference, such a C-reactive protein produced by liver, oxidative and inflammatory markers are generally analysed in isolation and did not represent the global inflammatory status (or proinflammatory, balanced or anti-inflammatory condition) (Szuster-Ciesielska et al., 2003; Hannestad et al., 2011; Mondelli et al., 2011; Beurel and Jope, 2014; Baumeister et al., 2016).

Therefore, we performed an *in vitro* investigation to evaluate the potential interaction between Li and antidepressant drugs (FLX, NOR, IMI and ESC) on inflammatory response, and to avoid interference of the two limiting aspects described above, we use a non-human macrophage cell line (RAW 264.7) to avoid some interference of genetic, lifestyle and healthy conditions factors in the results, and we compared data from an inflammatory ratio (IR) that

was calculated base in six oxidative-inflammatory markers [nitric oxide (NO), superoxide anion, reactive oxygen molecules (ROS), cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) and IL-10, an anti-inflammatory cytokine. The IR used in the *in vitro* protocol, was also validated by a complementary *in vivo* analysis with subjects who took blood samples to assess laboratorial presence of some body inflammation.

## Material and methods

### Cell culture conditions and experimental design

No-activated murine RAW 264.7 macrophages (ATCC TIB-71) were used as *in vitro* experimental model. We choose to perform the analysis using a non-human cell line to avoid any potential genetic interference in the results obtained from drug treatments. The cells were cultured with DMEM medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 mg/mL). All experiments were performed at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> incubator and were three times replicated. Initially, cells (1 x 10<sup>5</sup>) were seeded in 6-well plates and allowed to adhere for 24 h. All reagents used in cell culture are from Sigma Aldrich (USA), whereas experiments were performed using commercial formulations of each psychiatric drugs tested here. All experiments were performed in triplicate.

Therapeutic concentrations of each drug recognised as effective in the treatment of depressive symptoms (Schatzberg and Nemeroff, 2009) were adapted to cell culture conditions. Curve concentration of these drugs was constructed by analysis of two lower and two higher concentration related to therapeutic dose of each drug: Li = 0.17, 0.35, 0.7, 1.4 and 2.8 mEq; IMI = 50, 100, 200, 400 and 800 ng/mL; NOR = 25, 10, 100, 200 and 400 ng/L; FLU = 50, 100, 200, 400 and 800 ng/mL; ESC = 12.5, 25, 50, 100 and 200  $\mu$ g/L). Phytohemagglutinin (PHA) as positive control of macrophages inflammatory response at 40  $\mu$ g/mL concentration. PHA is a lectin antigen found in some plants that is able to induce mitosis and inflammatory response in immune cells (BARBISAN et al., 2017).

The follow parameters were used to evaluate the potential inflammatory modulation by psychiatric drugs on 72 h cell culture RAW macrophages: cell viability and proliferation; quantification of the oxidative markers nitric oxide (NO); superoxide anion, reactive oxygen species (ROS) and IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and IL-10 cytokines levels. The pharmacogenomics effect of drugs on gene modulation of cytokines studied here was investigated by qRT-PCR.

### Inflammatory ratio (IR) analysis

IR was calculated from the follow equation:  $IR = [\% \text{ of control of proinflammatory markers}] / [\% \text{ of control of IL-10 cytokine} \times 6]$ . The follow six proinflammatory markers were including in the equation: NO, Superoxide anion, ROS levels, and cytokines levels IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ]. The sum of proinflammatory markers was divided by IL-10 (% of control and multiplied by six), since were evaluated six proinflammatory markers in order to obtain a 1 ratio. Equation applied to control cells found value 1 since all variables are considered as 100%. Considering standard errors related to some variation on experimental conditions, treatments with values below 1 ( $> 0.8$ ) were considered with anti-inflammatory effect, whereas treatments with values  $> 1.2$  were considered with proinflammatory. Values between 0.81 and 1.19 were considered similar to untreated cells. The IR use decreased potential variations in the moment of inflammatory cascade decreasing data misinterpretation.

As *in vitro* analysis presents some methodological constraints, we tried to validate IR using a complementary *in vivo* human was performed to confirm the association between inflammatory status of IR values by comparison with C-reactive protein (CRP) levels. We performed this comparison because CRP considering an important marker of inflammation, being synthesized by the liver in response to factors released mainly by macrophages, such as IL-6 (Magro et al., 2014). Elevate CRP levels has been associated with psychiatric disorders, including Bipolar disorder (Hamdani et al., 2013) and some investigations also suggested that CRP could be modulated by Li and antidepressant drugs (Köheler et al., 2017).

The cytokines and CRP levels were analysed from information of 154 subjects previously enrolled in a broader research project in which the gene–environmental interaction associated with the aging processes and chronic diseases (Genesis project) developed in free-living populations in southern Brazil region by Biogenomic Lab from Federal University of Santa Maria (UFSM, RS, Brazil). Details are described in Duarte et al (2010; 2017), that evaluated association between a single nucleotide polymorphism (SNP, rs 4880) located in the superoxide dismutase manganese dependent enzyme (Val16Ala-SOD2) with no-hypercholesterolemic and hypercholesterolemic subjects and also evaluated the potential pharmacogenetic effect of this polymorphism on rosuvastatin treatment. IR of each human subject was calculated from a follow equation:  $IR = [IL-1\beta + IL-6 + TNF\alpha] / [IL-10 \times 3]$ . The study was approved by Human Ethics Committee of each university (UFSM, number 23081.009087/2008). In the occasion of

prior data collection, all participants gave written informed consent prior to participating in this study.

#### Laboratorial analysis

All analyzes involving measurement of absorbance or fluorescence were performed with SpectraMax i3x Multi-Mode microplate reader (Molecular Devices- Sunnyvale, CA- USA). Cell viability and proliferation were firstly determined by the MTT (3- [4,5dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolic bromide) reduction spectrophotometric assay (Machado *et al*, 2015) and flow cytometry (Accuri BD C6, Franklin Lakes, NJ-USA) described in Azzolin *et al*, 2016.

The quantification of NO and Superoxide anion was performed by spectrophotometry using methods previously described in the literature respectively for Jung *et al.*, 2016 and Morabito *et al.*, 2010. The ROS production was determined using the 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorimetric assay according to Barbisan *et al.*, 2014.

The cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and IL-10) in the cell culture supernatants was measured, according to the manufacturer's instructions; following previously described methodological details in Jung *et al*, 2016. The gene expression of these cytokines was determined by quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis by Rotor-Gene Q 5plex HRM System (QIAGEN, Hilden-Germany). Total RNA of each treatment was extracted using Trizol (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA-USA). To perform reverse transcription, RNA was added to the samples of RNA (1000 ng/ $\mu$ L) with 0.2  $\mu$ L of DNAase (Invitrogen Life Technologies, USA) at 37°C for 5 minutes, followed by heating at 65°C for 10 minutes. The cDNA was generated with 1  $\mu$ L of Iscript cDNA and 4  $\mu$ L of Mix Iscript (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA-USA) according to the following reaction conditions: 5°C for 10 minutes, 25°C for 5 minutes, 85°C for 5 minutes and finally 5°C for 60 minutes.

The qRT-PCR was conducted under the following reaction conditions: 95°C for 3 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s followed by a melt curve of 60°C to 90°C in 0.5°C increments for 5 s. The q RT-PCR reactions of each sample were made in triplicate, using 1  $\mu$ M of each primer, 1000 ng/ $\mu$ L of cDNA, RNAase-free water and 2x QuantiFast SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (QIAGEN Biotechnology, Germany), in a final volume of 20  $\mu$ L. The beta-actin gene was used as a housekeeping gene, and its expression level was used as an internal control. The relative expression was calculated using the comparative Cytosine-Timine (CT) and was expressed as the fold expression compared to the control.

The specific primer pairs of cytokines are presented used in this study were: IL-1 $\beta$  Forward GCGGCATCCAGCTACGAAT and Reverse ACC AGCATCTTCCTCAGCTTGT; IL-6 Forward TACCCCCAGGAGAAGATTCCA and Reverse CCGTCGAGGATGTACCGAATT; TNF- $\alpha$  Forward CAA CGGCATGGATCTCAAAGAC and Reverse TATGGGCTCATACCAGGGTTTG; IL-10 Forward GTGATGCCCAAGCTGAGA and Reverse TGCTCTTG TTTTCACAGGGAAGA.

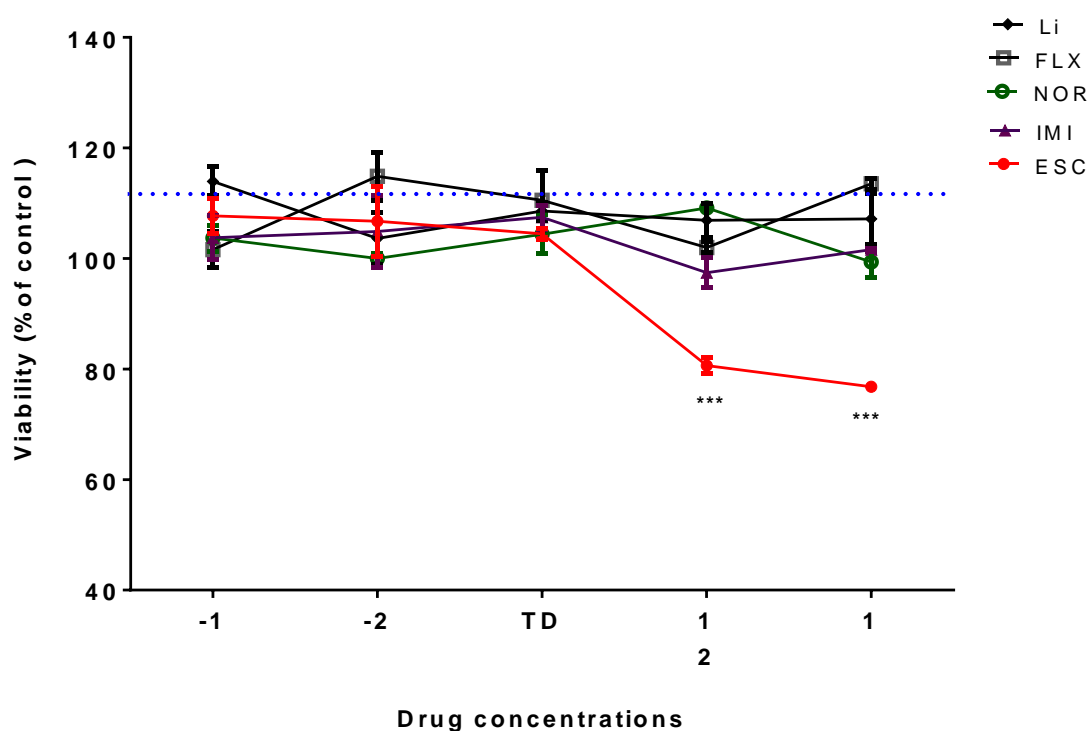
The effect of the treatments on gene modulation was also evaluated comparing the rate of pro-inflammatory cytokine gene expression (PI) in relation to anti-inflammatory IL-10 expression (AI). The maximum value of PI/AI rate considered was 10 times higher than the control group, in order to construct an elucidative graph. However, when the rate was higher than 10 times, this information was cited in the results section, below.

#### Statistical analysis

The *in vitro* statistical analyses were conducted employing GraphPad Prism 5 software. Data from each variable in the treatments and from IR were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey or Dunnet *post hoc* tests. The results of these analyses were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. In order to confirm that IR could represent an actual information of human blood inflammatory status, this ratio was calculated a sample subjects that are categorized in two groups: non-inflammation (NI) and with some inflammatory condition (IC) using CRP > 0.6  $\mu$ l/L as cut-off point reference. IR values comparison between NI and IC subjects was used to determine sensitivity, specificity, predictive value of IR values by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. The value of area under the curve (AUC) consider predictive was  $\geq$  0.70. From this analysis and percentile distribution a IR cut-off point was determined and frequency distribution between NI and IC was compared by chi-square analysis. Odds ratio (OR) and respective 95% confidence interval to IC present higher IR values was also calculated. A multivariate logistic regression analysis (Backward Wald method) was also used to determine the potential influence of sex and age on association of IR values and IC estimated by higher CRP levels. Results from *in vitro* and *in vivo* analyses with  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

Initially, cytotoxic effects of Li and antidepressant drugs tested here was evaluated. Any drug decreased significantly macrophage viability except when cells were exposed to higher ESC concentrations (Figure 1). PHA-activated macrophages did not change the viability when compared to no-activated control group (data no shown).



**Figure 1** Lithium (Li) and antidepressant drugs (FLX= fluoxetine; NOR=nortriptyline; IMI=imipramine; ESC= escitalopram) effect on RAW macrophages in 24 hours cell cultures. Concentrations of each drug was determined by estimative of plasmatic therapeutic dose (TD) (LI= 0.7ME/L; FLX=100 ng/L, NOR= 100ng/L, IMI = 200 ng/mL and ESC= 50 ng/L) and two lower (-2, -1) and two higher (1 -2) concentrations, that represented under and super dosing. Treatments were statistically compared by Anova One-Way followed by Tukey *post hoc* test. Concentrations with significant differences calculated by post hoc test ( $p \leq 0.05$ ). \*\*\*  $p < 0.0001$ .

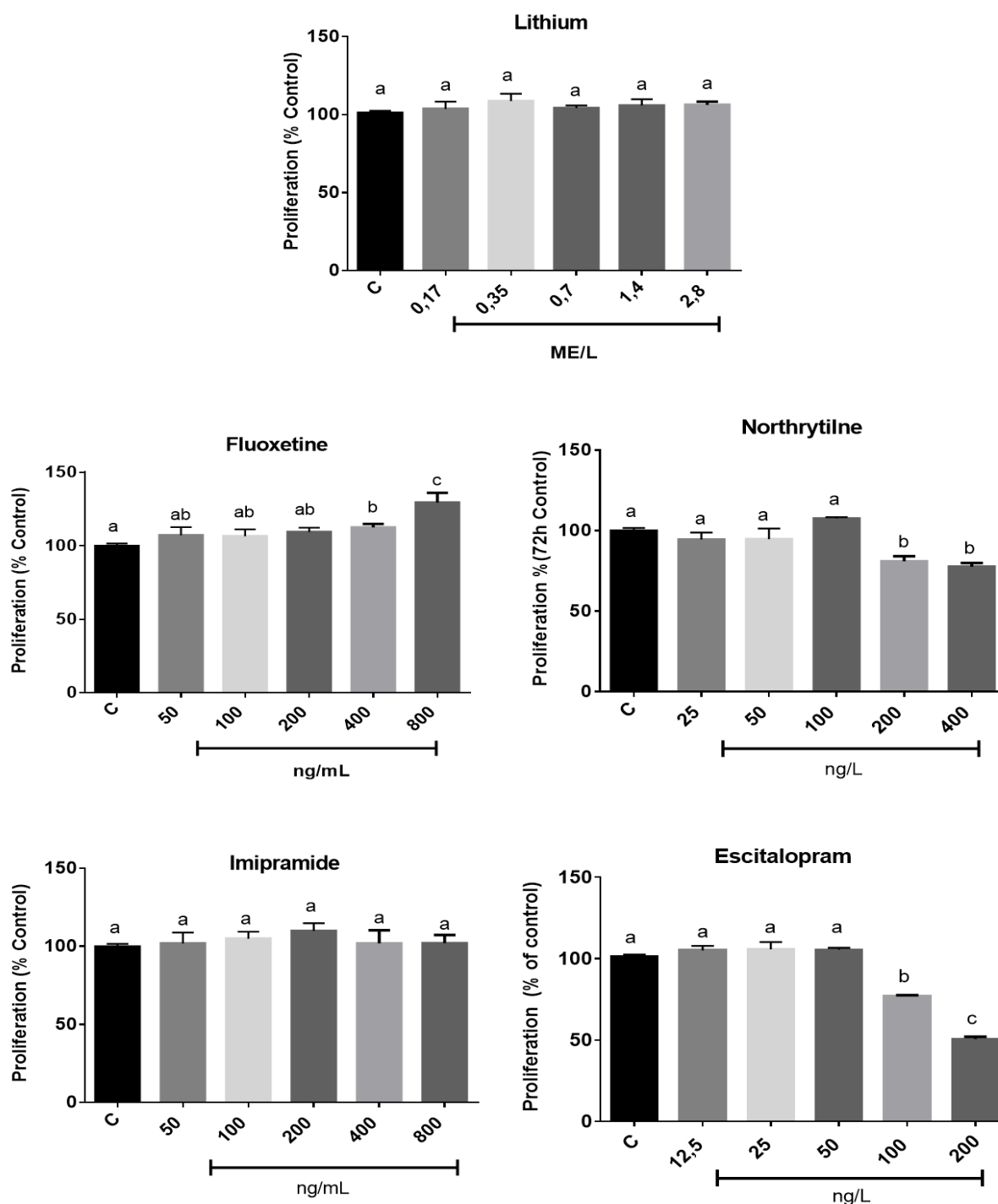
All Li concentrations tested here did not change cellular proliferation in 72 hours cultures when compared to control group (Figure 2) using MTT assay. Similar to Li, isolated antidepressant drugs at estimated therapeutic concentrations did not change significantly the cell proliferation pattern. However, higher FLX concentrations triggered increase of macrophage proliferation. At contrary, a lowering effect on cell proliferation was observed

when macrophages were treated with higher NOR and ESC concentrations ( $p \leq 0.01$ ). Not all concentrations of IMI affected macrophages proliferative rate.

As expected PHA-activated macrophages presented a significant increase of cellular proliferation ( $127.3 \pm 3.2 \%$ ) than untreated cells. However, any treatment showed similar proliferative rate than activated macrophages PHA exposed when compared to Control group.

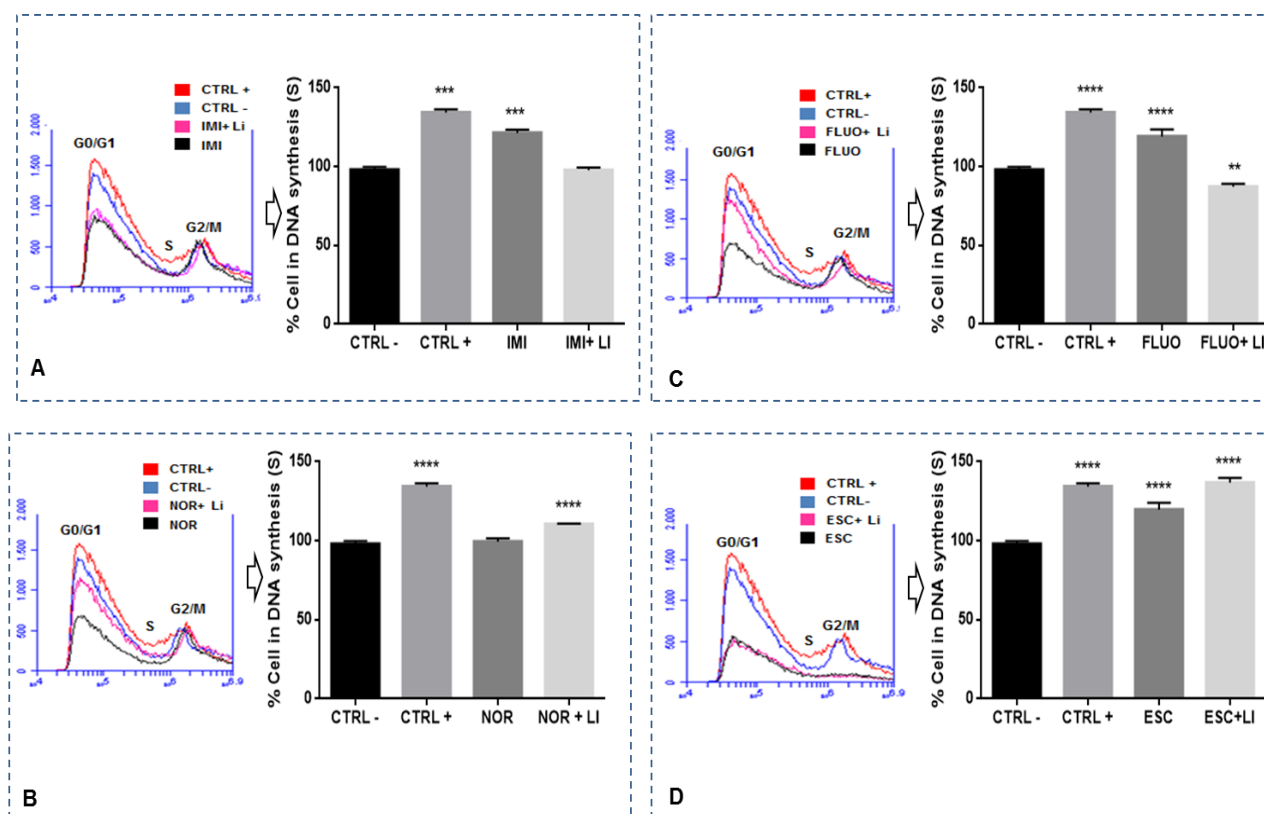
From these results, we performed all complementary analysis using just estimated therapeutic concentrations of Li (0.7 ME/L) and each antidepressant drug (FLX=100 ng/L, NOR= 100ng/L, IMI = 200 ng/mL and ESC= 50 ng/L).

Interaction between Li and antidepressant drugs on cell proliferation was also evaluated by flow cytometry analysis in 72 h cell cultures. In this analysis, we compared Li plus antidepressant drugs in relation to untreated and PHA-activated macrophages. Li presented similar frequency of S-phase cells than Control group. However, as can see in Figure 3, FLX, IMI and ESC increased frequency of S phase cells that indicate a proliferative state. NOR did not change this frequency when compared to C group.



**Figure 2** Effect of Li and antidepressant drugs on 72 hours cell culture proliferation of macrophages RAW 264.7 measured by MTT assay. Concentrations of each drug was determined by estimative of plasmatic therapeutic dose (Li= 0.7ME/L; FLX=100 ng/L, NOR= 100ng/L, IMI = 200 ng/mL and ESC= 50 ng/L) and two equal and lower and two equal and higher concentrations, that represented under and super dosing, respectively. Treatments were statistically compared by Anova One-Way followed by Tukey post hoc test. Concentrations with significant differences calculated by *post hoc* test ( $p \leq 0.05$ ) were identified by different letters.





**Figure 3** Effect of Li and antidepressant drugs on macrophage cell cycle evaluated by flow cytometry. A representative flow cytometry cell cycle analysis of each antidepressant drug is showed plus graphic bars representing % of cells in S-phase cycle. Concentrations of each drug was determined by estimative of plasmatic therapeutic dose (Li= 0.7mEq/L; FLX=100 ng/L, NOR= 100ng/L, IMI = 200 ng/mL and ESC= 50 ng/L. Treatments were statistically compared by Anova One-Way followed by Tukey *post hoc* test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

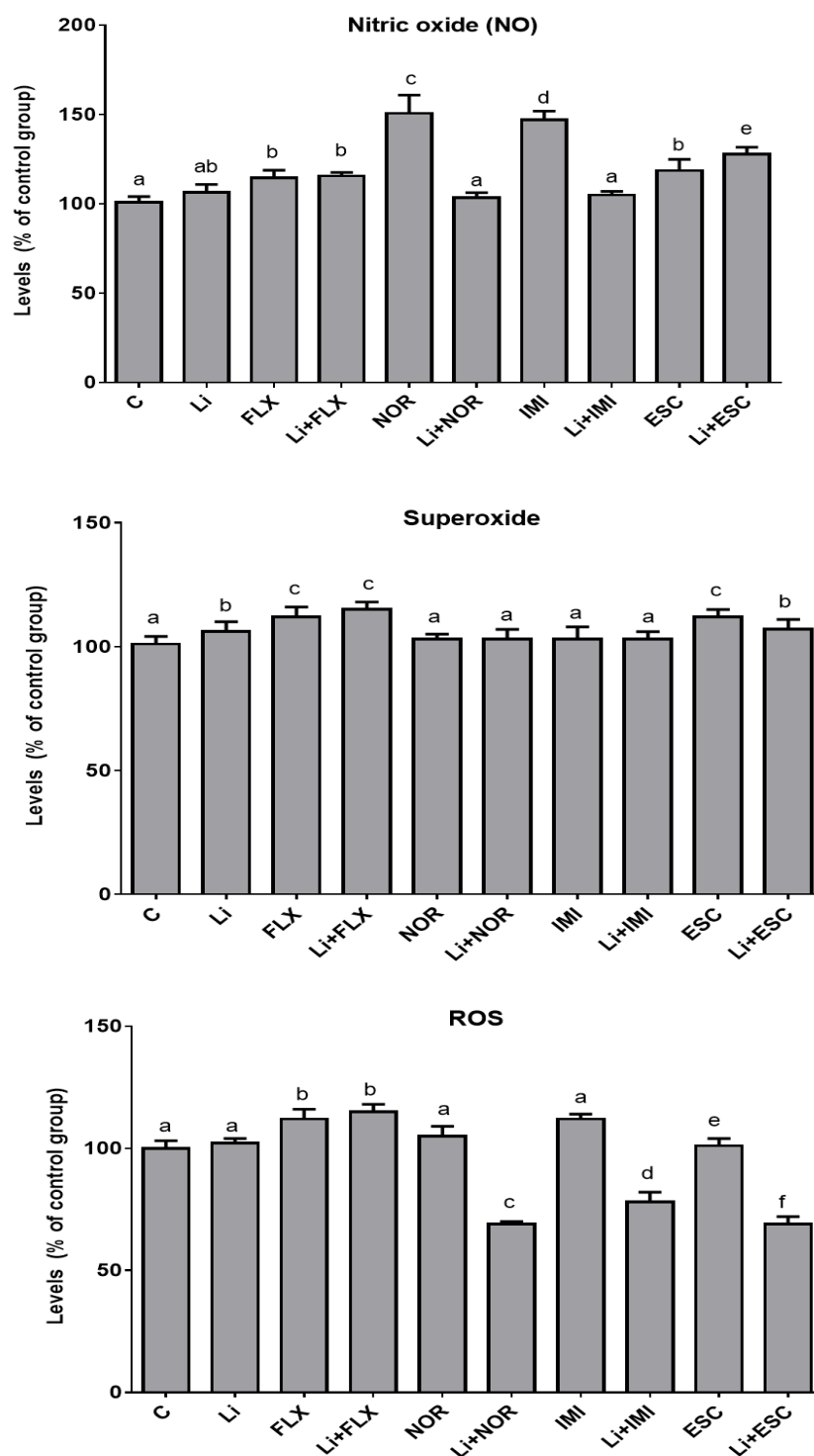
Interaction between Li + FLX and Li + IMI decreased the frequency of S-phase cells, whereas interaction between Li + NOR or Li + ESC triggered increase in the frequency of S-phase cells.

The levels of oxidative metabolism markers related to inflammatory response were also compared among treatments and results are presented in Figure 4. NO levels of Li, Li + NOR and Li + IMI were similar to Control group. FLX, Li+ FLX and ESC induced a slight increase of NO levels. Cells Li + ESC exposed showed moderate NO levels, whereas NOR and IMI exposure triggered higher NO levels than Control group. In relation to superoxide, cells Li or Li + ESC treated presented a slight increase of this oxidative molecule. Cells NOR, Li+NOR, IMI and Li+ IMI exposed did not change superoxide levels when compared to Control group. FLX, Li+ FLX and ESC exposure triggered higher superoxide levels than Control group. ROS levels

were similar to Control group when exposed to Li, NOR and IMI treatments. Li + NOR, Li + IMI and Li+ESC had a lowering effect on ROS levels. At contrary, FLX, Li+ FLX present a slight increase in ROS levels than Control group.

As expected PHA-activated cells presented higher levels of NO ( $123.4 \pm 4.5$  % of control), superoxide ( $133.7 \pm 5.2$  % of control) and ROS ( $147.6 \pm 3.8$  % of control).

Results of cytokine levels and gene expression analysis are shown in Figure 4, and presented differential pattern according to treatment with and without Li exposure.



**Figure 4** Effect of Li and antidepressant drugs on 72 hours cell culture proliferation of macrophage RAW 264.7 on three oxidative markers: nitric oxide (NO), superoxide and reactive oxygen species (ROS). Concentrations of each drug was determined by estimative of plasmatic therapeutic dose (Li= 0.7ME/L; FLX=100 ng/L, NOR= 100ng/L, IMI = 200 ng/mL and ESC= 50 ng/L) Treatments were statistically compared by Anova One-Way followed by Tukey post

hoc test. Different letters identified concentrations with significant differences calculated by post hoc test ( $p < 0.05$ ).

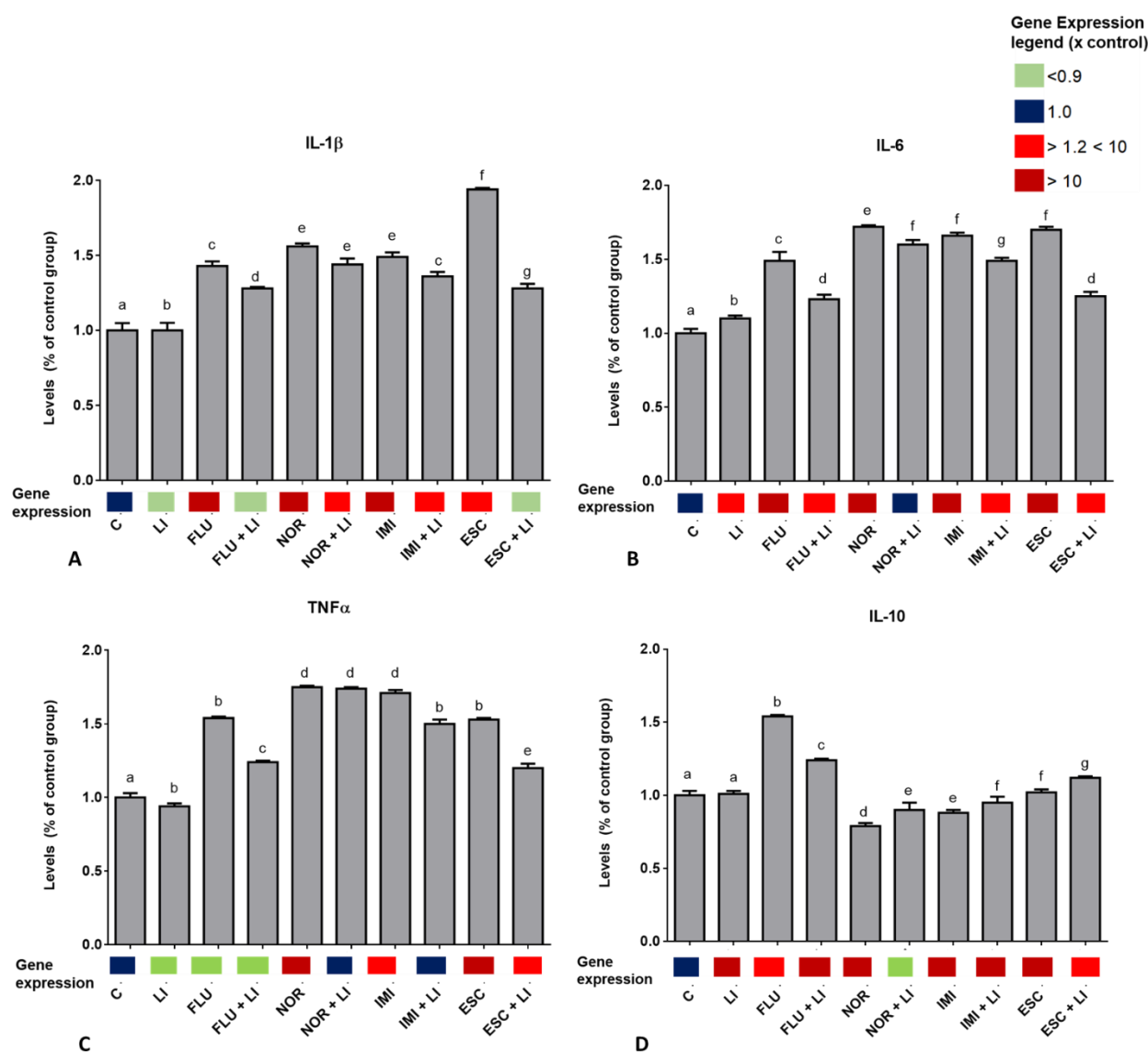
Cells treated With Li presented similar IL-1 $\beta$  levels than Control group. All antidepressant drugs increased the levels of this proinflammatory cytokine. Li exposed concomitantly with FLX, IMI and ESC decreased partially IL-1 $\beta$  levels in relation to cells just treated with these drugs. However, this effect was not observed in cells NOR exposed, that in the Li presence remained with higher IL-1 $\beta$  levels. IL-1 $\beta$  gene was downregulated in cultures Li, Li+ FLX and Li +ESC exposed. All treatments triggered up regulation of this gene. However, the intensity of over expression was attenuated in Li + NOR and Li + IMI in than cells treated with these isolated antidepressant drugs (NOR and IMI) (Figure 5A).

A higher concentration of IL-6 in comparison of Control group was observed in cells Li-exposed. However, these levels were lower than cells exposed to antidepressant drugs. Concomitant treatment with Li decreased the IL-6 levels of all drugs tested here. Except for Li+NOR, all treatments triggered up regulation of IL-6 gene when compared to Control group. However, the high gene expression was attenuated when cells were concomitantly treated with Li + FLX, Li + IMI and Li + ESC (Figure 5B).

A lowering effect on TNF- $\alpha$  levels was observed when cells were just Li exposed, whereas all antidepressant drugs presented higher levels of this proinflammatory cytokines when compared to Control group. Concomitant Li exposure decreased partially TNF- $\alpha$  levels triggered by FLX, IMI and ESC drugs. Again, in the presence of Li, cells NOR exposed maintained similar high levels of TNF- $\alpha$ . Gene expression analysis showed TNF- $\alpha$  downregulation in cells Li, FLX and Li + FLX treated. NOR and IMI caused up regulation of this gene, but this effect was reverted in the Li presence to levels similar to untreated cells (Control group).

Li + ESC treatment also decreased intensity of TNF- $\alpha$  up regulation found in cells just ESC exposed (Figure 5C).

Li and antidepressant drugs effect on IL-10, an anti-inflammatory cytokine was also investigated. When cells were just Li exposed IL-10 levels remained similar to Control group. FLX was the drug that trigger higher IL-10 levels than other treatments, that was slight attenuated in the presence of Li. The other drugs presented lowering effect on IL-10 levels, that was attenuated in the presence of Li. All treatments triggered up regulation of IL-10 gene, except when Li + NOR exposed, that showed downregulation of this gene (Figure 5D).

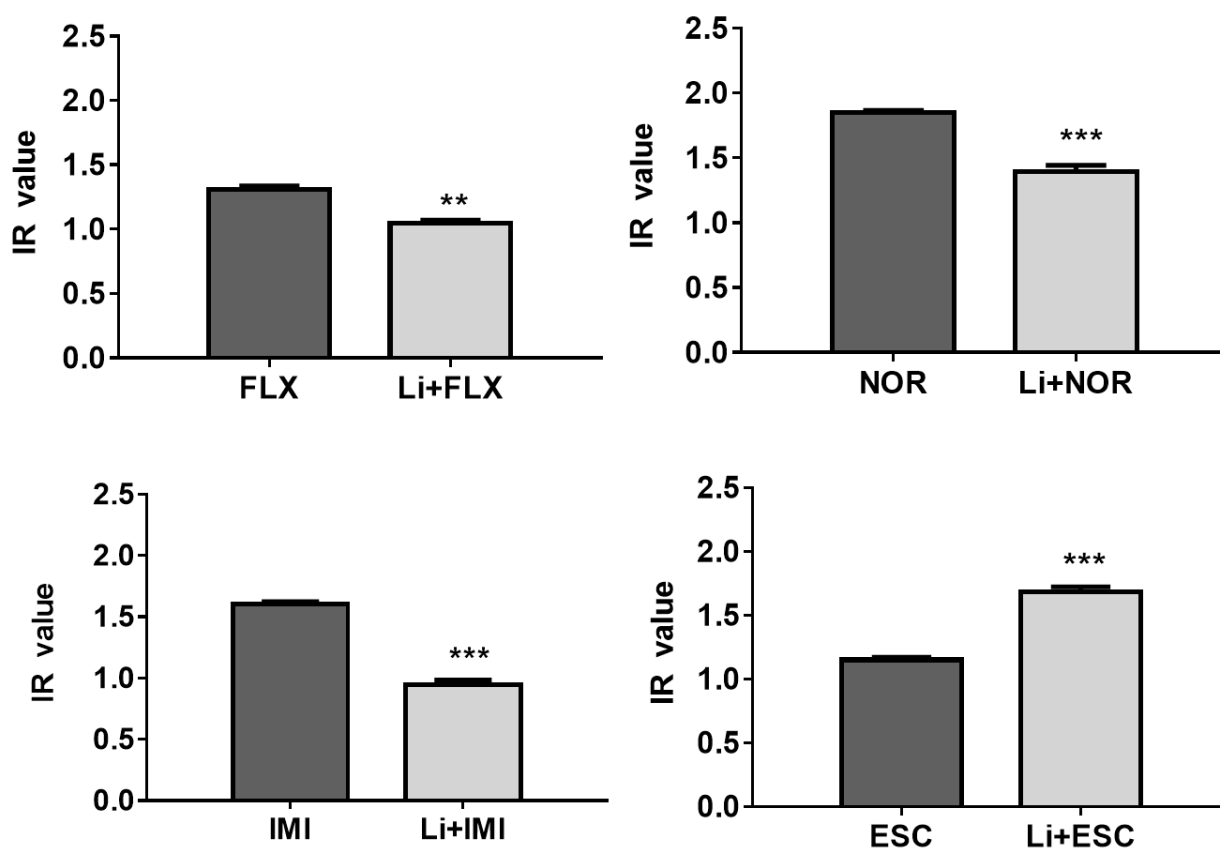


**Figure 5** Effect of Li and antidepressant drugs on 72 hours cell culture proliferation of macrophage RAW 264.7 on four cytokines: interleukin1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), IL-10, TNF $\alpha$ , IL-10. Concentrations of each drug used here was estimated from an expected plasmatic therapeutic dose (LI= 0.7ME/L; NOR= 100 ng/L, FLU=100 ng/L, IMI = 200 ng/mL and ESC= 50 ng/L) Treatments were statistically compared by Anova One-Way followed by Tukey post hoc test. Different letters identified concentrations with significant differences calculated by post hoc test ( $p < 0.05$ ). Gene expression of each cytokines are represented by coloured squares and were determined using untreated control group as reference to calculate the relative mRNA expression. The expression level of beta-actin was used as an internal control (housekeeping gene).

Activated-macrophages showed higher levels of all proinflammatory cytokines and lower IL-10 levels than control group. This treatment also triggered up regulation of IL-1 $\beta$ , IL-10 and TNF- $\alpha$  cytokines genes and downregulation of IL-10 gene. In relation of PHA treatment any Li and antidepressant drugs did not present similar results or these effects presented an intermediary pattern (data no shown).

As isolated results did not show a clear pro-inflammatory or anti-inflammatory pattern related to Li plus antidepressant drugs, IR was calculated and compared among treatments. In the *in vitro* protocol PHA-activated macrophages were used as reference of an pro-inflammatory response in 72 hours cell cultures, and as expected PHA-activated macrophages presented higher (IR=  $2.97 \pm 0.04$ ) than control group. However, other treatments did not show similar results found in PHA exposure.

In non-activated macrophages tested here, Li exposure showed IR similar to untreated cells -Control group (IR=  $1.02 \pm 0.02$ ). In general, cells treated with isolated antidepressant drugs presented a slight elevation of IR levels, which did not exceed 1.5 times their value in relation to control group. Concomitant Li and FLX, NOR and IMI decreased significantly IR values when compared with cells exposed with these isolated antidepressants. On the other hand, higher IR values were observed in Li + ESC when compared with control group and cells just ESC exposed (Figure 6).



**Figure 6** Comparison of Inflammatory ratio (IR) calculated by equation:  $[\text{NO} + \text{Superoxide} + \text{ROS} + \text{IL1}\beta + \text{IL6} + \text{TNF}\alpha] / [\text{IL-10} \times 6]$  in cells exposed to Li and three antidepressant drugs. Concentration of each drug used here was estimated from an expected plasmatic therapeutic dose (LI= 0.7ME/L; NOR= 100ng/L, FLU=100 ng/L, IMI = 200 ng/mL and ESC= 50 ng/L) Treatments were statistically compared by Student t test.

A complementary analysis using *in vivo* data was performed to evaluate if a similar (but not equal) IR could represent an actual inflammatory state of human patients. Initially we categorized sample by CRP using a cut-off point of 0.6  $\mu\text{l/L}$  in a NI and IC groups, and we compared the main cytokines levels analysed here and IR values (Table 1). Results showed that proinflammatory cytokine levels and IR values were higher in IC group, whereas IL-10 levels were lower than NI group.

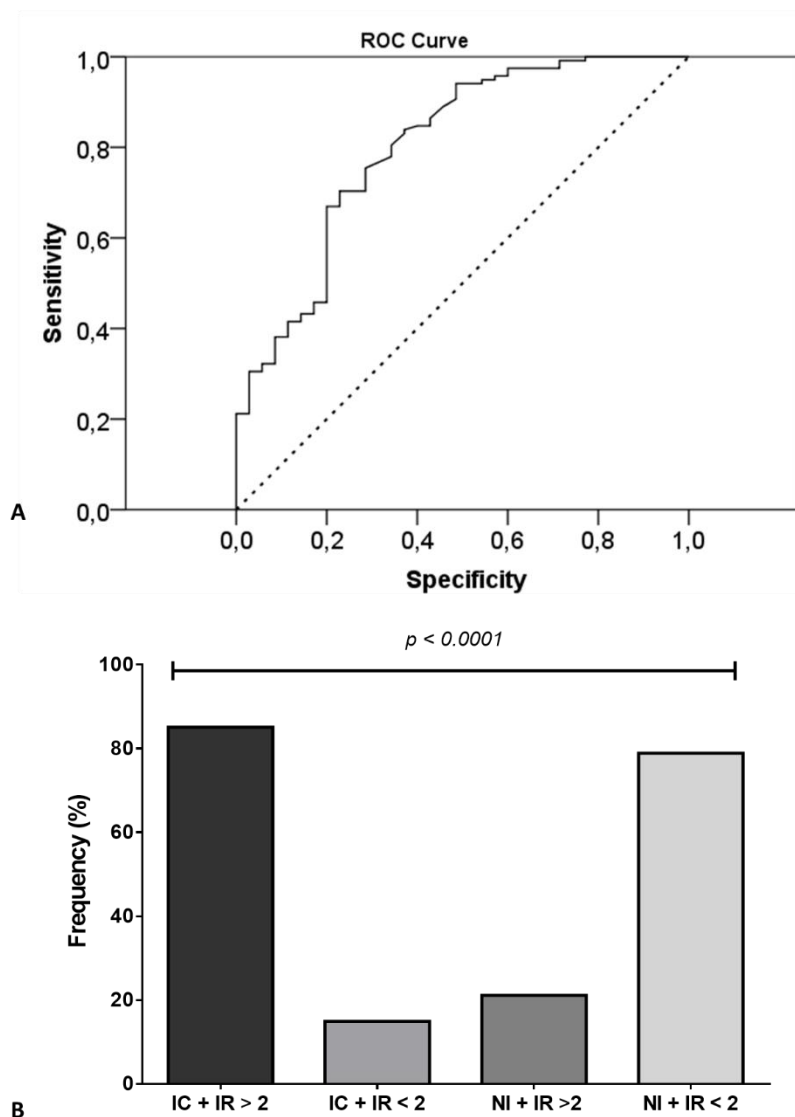
**Table 1** Characteristic baselines of sample subjects used to calculate IR from blood peripheral cytokines levels categorized by CRP levels

Variables	CRP groups			
	NI Group		IC Group	
	Mean $\pm$ SD	Median	Mean $\pm$ SD	Median
CRP ( $\mu$ l/L)	0.37 $\pm$ 0.14	0.35	1.99 $\pm$ 1.6	1.15
IL-1 $\beta$ (ng/mL)	93.7 $\pm$ 74.0	83.0	199.7 $\pm$ 80.5	165.5
IL-6 (ng/mL)	117.3 $\pm$ 78.7	105.0	224.7 $\pm$ 87.9	179.0
TNF $\alpha$ (ng/mL)	137.9 $\pm$ 83.5	134.0	247.9 $\pm$ 92.5	213.0
IL-10 (ng/mL)	64.3 $\pm$ 18.7	59.0	56.19.9	53.0
IR value <sup>#</sup>	2.2 $\pm$ 2.0	3.0	4.9 $\pm$ 3.3	1.5

SD= standard deviation; IR = inflammatory ratio calculated by equation:  $IR = [IL-\beta + IL-6 + TNF\alpha] / [IL-10 * 3]$ . Comparison between two groups showed that all variables had  $p < 0.001$  determined by Mann-Whitney non-parametric test since values did not present a normal distribution calculated by Kolmogorov-Smirnoff test.

A ROC analysis was applied to evaluate the accuracy of diagnosis based on the identified potential association between CRP inflammatory marker and IR values. The area under the curve (AUC) of ROC to IR was 0,803 (0,715-890 95%CI) (Figure 7A). From ROC curve and percentile distribution we established a IR cut-off point = 2. This IR value was related to a sensibility = 0.915 and specificity = 0.486. Comparison of frequencies showed higher association between NI and IC groups (Figure 7B). Odds ratio showed that subjects with  $IR > 2.0$  presented a chance belongs to IC than NI group. The calculated OR showed 4.041 (1.687-9.681 95%CI) times higher chance of IC group has higher IR higher than 2 values than NI group. A multivariate analysis showed that association between higher CRP levels and IR values was independent of sex and age of sample.





**Figure 7** Analysis of IR values in human subjects. (A) ROC curve showing that accuracy of IR values to predict inflammatory status using as reference CRP levels, constructed from data of 154 human subjects (AUC= area under de curve > 0.8); (B) Comparison of PCR categories (IC= inflammatory condition and NI= non-inflammatory condition) frequency and inflammatory ratio (IR) < and  $\geq 2$  value by chi-square test.

## Discussion

The present investigation analysed if the Li anti-inflammatory effect could be maintained on Li interaction with four antidepressant drugs used in the psychiatric clinical practice. The whole of results evaluated mainly by IR values, suggested that Li maintained

similar inflammatory balance that found in untreated non-activated macrophage cells, but this effect was substantially changed in the presence of antidepressant drugs. When Li interacted with FLX, NOR or IMI drugs an anti-inflammatory effect was detected. At contrary, the interaction between Li and ESC triggered increase in the IR values suggesting a proinflammatory effect.

Before we discuss more deeply these results is important to point out that data described here were obtained using a novel methodological strategy, in order to decrease misinterpretation of results and clarify the whole of data obtained in the experiments.

In this strategy, we used a murine RAW 264.7 macrophage cells. Its cell line is popular mainly in exploratory experiments about putative biological agents or drugs (Talmadge et al., 2007). However, there are some investigation that consider this cell line not so good to evaluate inflammatory response, since is usually slow to respond to stimulation and often constitutively exhibit high levels of cytokines in the absence of stimulant, including high levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (Merly and Smith, 2017). Despite these limitations we believe that RAW cells could be useful in the *in vitro* studies considering some important methodological points, such as conducted analysis just in 72 hours cell cultures and considering as basal reference of cytokines and other molecules levels as found in untreated control cells cultured concomitantly to treatments and in the same conditions. We also believe that use of IR analysis can help to decrease methodological concerns related to use of macrophage RAW 264.7 cells *in vitro* protocols.

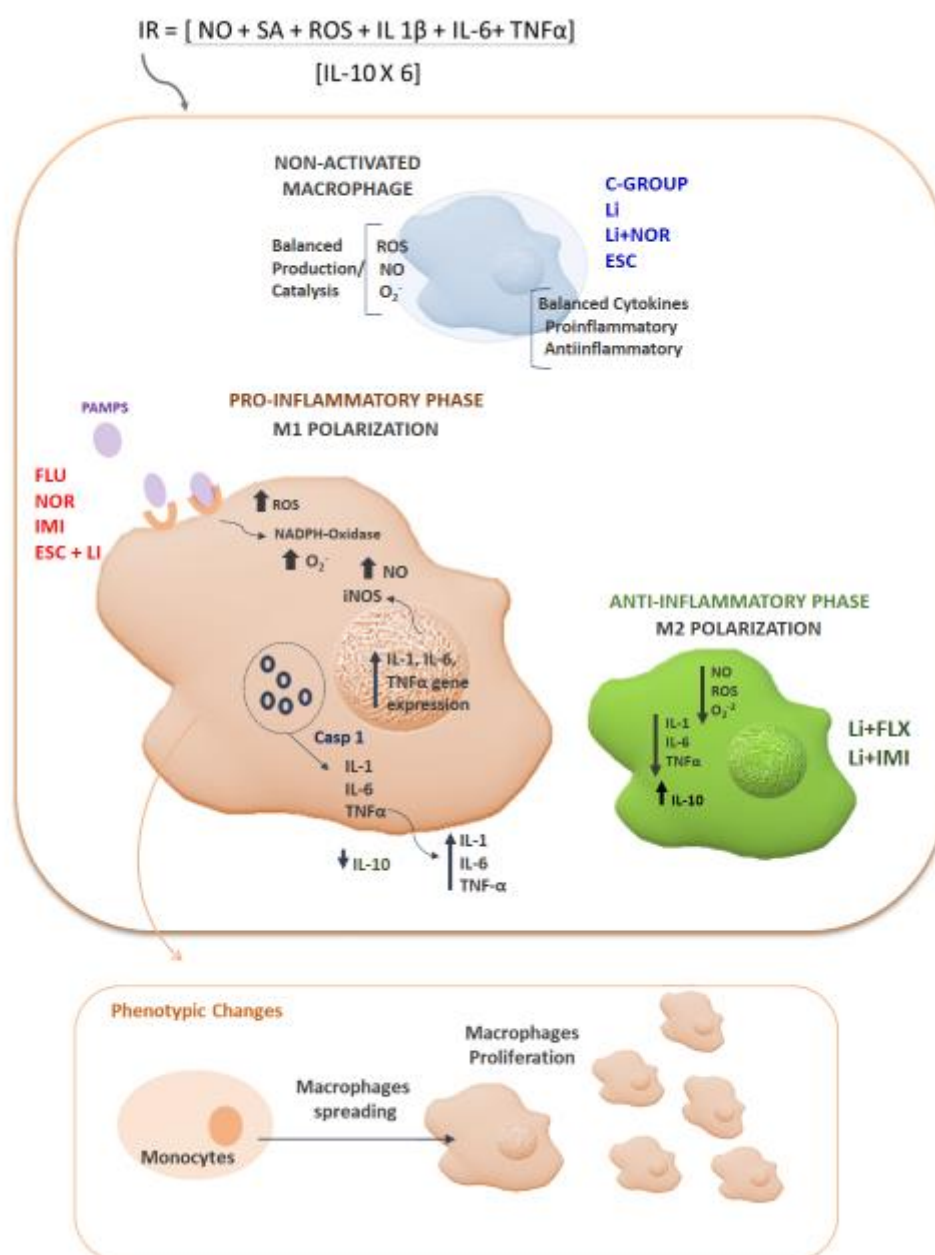
We also avoid using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), because human beings present some genetic variations that could affect inflammatory response, such as Val16Ala-SOD2 SNP that change the efficiency of superoxide dismutase manganese dependent (SOD2) that is key enzyme in the control of superoxide levels produced into mitochondria. Particularly, VV genotype present is associated with metabolic diseases, such as hypercholesterolemia, obesity diabetes mellitus complications (review in Bresciani et al., 2015), and resistance anti-inflammatory and antioxidant effect related to rosuvastatin intake by hypercholesterolemic subjects (Duarte et al., 2016). A recent *in vitro* study performed by Barbisan et al (2017) suggested that basal superoxide-hydrogen peroxide imbalance associated with Val16Ala-SOD2 SNP could affect the intensity of immunosenescence markers, and that specially VV-cells were associated with higher proinflammatory cytokine levels. The genetic variation that cause superoxide-hydrogen peroxide imbalance or other biochemical alterations could affect the

immune cells response and have some impact on results obtained and its interpretation. Moreover, there are *in vitro* studies showing differential response of PBMCs carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes to different environmental, nutritional and pharmacological agents (Montagner et al., 2010; Algarve et al., 2013; Barbisan et al., 2014; Capeleto et al., 2015; Dornelles et al., 2017; Shoot et al., 2017).

In the *in vitro* protocol, the macrophage activation were confirmed by use of PHA-antigen to trigger inflammatory response increase the oxidative and cytokine levels, cellular proliferation, upregulation of proinflammatory cytokines genes and down regulation of IL-10 gene. For this reason, PHA-cells presented higher IR values ( $> 2.5$ ) when compared with untreated cells and cells Li and antidepressant drugs exposed. As results observed from cell proliferation and gene modulation were heterogeneous, we solved to did not include these variables in IR equation, and just use them to confirm macrophage inflammatory status.

Moreover, the use of these would make it impossible to validate *in vitro* IR data by similar analysis in human beings. In fact, we performed a complementary *in vitro* study using similar IR equation and CRP as reference of subject's inflammatory condition. The results of this protocol showed  $AUC > 0.8$  that indicates accuracy and predictability of IR as variable to indicate inflammatory status, since was used as reference CRP levels. CRP is a blood marker of inflammatory states. This molecule is synthesized by the liver in response to signal factors released by macrophages and fat cells, upon stimulation by the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  during acute-phase inflammatory response, and elevate levels of this protein have been observed in BP patients (Chang et al., 2017). For this reason, we believe to have found an important association between CRP and IR levels. On the other hand, these results corroborate the use of IR values in the *in vitro* evaluation of psychiatric drugs, since in these conditions is not possible to quantify CRP as inflammatory marker.

Considering the experiments performed by IR analysis, we organized Figure 8 that shows a synthesis of markers studied here, specially cytokines and oxidative molecules that compound IR equation and main results obtained from cells Li and antidepressants treated.



**Figure 8** Scheme of main results associated with Lítio (Li) effect in interaction of four antidepressant drugs (FLX= fluoxetine; NOR= nortriptyline; IMI=imipramine; ESC= escitalopram) on inflammatory status of 72 hours macrophages RAW 264.7 cultures by inflammatory ratio (IR) equation. ROS: reactive oxygen molecules, NO= nitric oxide, C group= Control group, O<sub>2</sub><sup>-</sup> = Superoxide, PAMPS: Pathogen-associated molecular pattern, iNOS= Nitric oxide synthase

In our study, we tested Li effects on non-activated macrophages (i.e RAW monocyte-like cells) and observe that this drug present inflammatory balance similar to untreated cells. This result suggest that Li anti-inflammatory effect could be potentially amplified by inflammation patterns observed in some health conditions including psychiatric diseases, such as Bipolar disorder. In our study, Li was able to revert some slight inflammatory pattern depending of type of antidepressant drug. FLX, NOR and IMI concomitantly Li exposure present a clear decreasing in IR values whereas, concomitant ESC exposure caused an inverse effect.

Fluoxetine and Escitalopram antidepressant drugs that are selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), Imipramine and Nortryptiline, tricyclic antidepressants were investigated here. Several studies have indicated that SSRIs play a modulatory role on immune system, especially in major depressive patients, that present normalization of plasma proinflammatory cytokines levels (Hannestad et al., 2011). In fact, IR values was not so high to FLX, NOR and IMI and interaction of Li had a clear anti-inflammatory effect suggesting that concomitant use of these drug would not negative in terms of inflammatory metabolism.

However, it seems that such effects are not universal and are dependent on several baseline conditions of the study and been influenced by SSRIs type, since we observed a proinflammatory effect when macrophages cells were concomitantly treated with Li + ESC. ESC is considered most selective of the SSRIs, and some prior studies, described that its SSRIs increased the levels of IL-receptor agonist and IL-2 in major depressive patients and have some anti-inflammatory effect (Chavda et al., 2011; Ho et al.,2016).

A protocol evaluated effect of ESC on TNF- $\alpha$  and IL-10 levels in mice with inflammatory condition induced by lipopolysaccharide (LPS) administration. Authors reported that ESC had anti-inflammatory and antidepressant effects on LPS-induced mice suggesting that is probably that serotonergic system plays a crucial role in the pathophysiology of inflammation-induced depression (Dong et al., 2016).

On the other hand, a recent study conducted by Avitsur et al (2017) described contrary results related to ESC action on inflammation LPS-induced in mice. In this study, ESC augmented the secretion of lipopolysaccharide-induced TNF $\alpha$  and induced a faster kinetics of IL-1 $\beta$  indicating a proinflammatory effect. Considering human clinical studies, it is interesting to comment results from an investigation that evaluated the effect of a single daily dose of 10 mg ESC or placebo for four weeks intake by first degree relatives to patients with depression on cytokines modulation. The results did not show any differences among cytokine levels between

subjects ESC or placebo treated suggesting that there is not a global anti-inflammatory effect of ESC (Haastrup et al., 2012).

Human investigations also described that immune effect of some antidepressant drugs, such as ESC and NOR could be dependent of basal inflammatory markers. Patients with higher CRP, IL-6 and TNF- $\alpha$  levels showed treatment resistance (review in Schmidt et al., 2016). Therefore, currently data are confusing about ESC effects on inflammatory modulation. In this way, our results showing proinflammatory action of Li + ESC interaction cannot be discarded and deserve complementary *in vivo* investigations.

In conclusion, despite methodological constraints related to *in vitro* protocols, results described here from a novel IR analysis suggest that Li has not a universal anti-inflammatory effect, that could be influenced by basal macrophage-inflammatory state and by the interaction of other psychiatric drugs. Despite the investigation to be performed by *in vitro* protocol, results described here could have relevance in psychiatric clinical practice, in respect to variation of response on inflammatory metabolism related to combination of Li and antidepressant drugs.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Biogenomic Laboratory research team that help us in some experimental protocols. The study was supported by Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and CAPES with grants and fellowships.

### **Author Contributions**

Conceptualization: FB; PASPL, IBMC

Formal analysis: FB; PASPL; IBMC

Funding acquisition: EER; MMMFD; IBMC

Investigation: FB; VFA; CFT; DC; GCM; IECJ; MMMFD

Methodology: FB; VFA; CFT; DC; GCM; IECJ; PASPL, IBMC

Resources: FB; PASPL; IBMC

Supervision: IBMC

Validation: PASPL; IBMC

Writing – FB; PASPL; EER; IBMC

Writing – review & editing: FB; PASPL; EER; IBMC

## References

Freeland KN, Cogdill BR, Ross CA, Sullivan CO, Drayton SJ, Vandenberg AM, Short EB, Garrison KL. Adherence to evidence-based treatment guidelines for bipolar depression in an inpatient setting. *Am J Health Syst Pharm.* v.72 (23 Suppl 3):S156-61, 2015.

Holder SD. Psychotic and Bipolar Disorders: Bipolar Disorder. *F.P. Essent.* v.455, p.30-35, 2017.

Marmol, F. Lithium: bipolar disorder and neurodegenerative diseases Possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* v.32. p.1761-1771, 2008.

Prosser JM, Fieve RR. Patients receiving lithium therapy have a reduced prevalence of neurological and cardiovascular disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* v.71, p.39-44. Epub 2016 Jun 17.

Decker M, Muñoz-Torrero D. Special Issue: "Molecules against Alzheimer". *Molecules,* v.16, p.21- 32, 2016.

Guttuso T Jr. Low-dose lithium adjunct therapy associated with reduced off-time in Parkinson's disease: A case series. *J Neurol Sci.* v.368, p.221-222, 2016.

Ayorech Z, Tracy DK, Baumeister D, Giaroli G. Taking the fuel out of the fire: evidence for the use of anti-inflammatory agents in the treatment of bipolar disorders. *J Affect Disord.* v.174, p.467-78, 2015.

Chang HH, Chen PS, Wang TY, Lee SY, Chen SL, Huang SY, Hong JS, Yang YK, Lu RB. Effect of memantine on C-reactive protein and lipid profiles in bipolar disorder. *J Affect Disord,* v.22, p.151-157, 2017.

Sayana P, Colpo GD, Simões LR, Giridharan VV, Teixeira AL, Quevedo J, Barichello T. A systematic review of evidence for the role of inflammatory biomarkers in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* v.92, p.160-182, 2017.

Luca A, Calandra C, Luca M. Gsk3 Signalling and Redox Status in Bipolar Disorder: Evidence from Lithium Efficacy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3030547. doi: 10.1155/2016/3030547. Epub 2016 Aug 18.

Muneer A. Wnt and GSK3 Signaling Pathways in Bipolar Disorder: Clinical and Therapeutic Implications. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* v.15(2), p.100-114, 2017.

van den Ameele S, van Diermen L, Staels W, Coppens V, Dumont G, Sabbe B, Morrens M. The effect of mood-stabilizing drugs on cytokine levels in bipolar disorder: A systematic review. *J Affect Disord.* v.203, p.364-73, 2016.

Zullino D, Baumann P. Lithium augmentation in depressive patients not responding to selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacopsychiatry.* v.34(4), p.119-127, 2001.  
Nierenberg AA, Petersen TJ, Alpert JE. Prevention of relapse and recurrence in depression: the role of long-term pharmacotherapy and psychotherapy. *J Clin Psychiatry.* 2003;64 Suppl 15:13-7. Review.

Freemantle N. No difference in depression relapse rates between maintenance electroconvulsive therapy and lithium plus nortriptyline. *Evid Based Ment Health.* v.10(3), 2007.

Edwards SJ, Hamilton V, Nherera L, Trevor N. Lithium or an atypical antipsychotic drug in the management of treatment-resistant depression: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol* , v.17(54): p.1-190, 2013.

Saini R, Raju MS, Chaudhury S, Srivastava K. Accelerated antidepressant response to lithium augmentation of imipramine. *Ind Psychiatry J.* v.25(1), p.93-100, 2016.

Ayorech Z, Tracy DK, Baumeister D, Giaroli G. Taking the fuel out of the fire: evidence for the use of anti-inflammatory agents in the treatment of bipolar disorders. *J Affect Disord.* V.174, p.467-78, 2015.

Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res.* v.47(10), p.781-92, 2013, Review.

Bresciani G, da Cruz IB, González-Gallego J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation *Adv Clin Chem.* v.68, p.87-130, 2015.

Barbisan F, Azzolin VF, Ribeiro EE, Duarte MMMF, da Cruz IBM. The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence. *Rejuvenation Res.* 2017 May 10. doi: 10.1089/rej.2016.1892. [Epub ahead of print].

Szuster-Ciesielska A, Tustanowska-Stachura A, Słotwińska M. In vitro immunoregulatory effects of antidepressants in healthy volunteers. *Pol J Pharmacol* 55:353–362, 2003.

Hannestad J; DellaGioia N; Bloch M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology* 36: 2452-2459, 2011.

Mondelli V, Cattaneo A, Belvederi Murri M. Stress and inflammation reduce brain-derived neurotrophic factor expression in first-episode psychosis: a pathway to smaller hippocampal volume. *J. Clin Psychiatry* 72:1677–1684, 2011.



Beurel E, Jope RS. Inflammation and lithium: clues to mechanisms contributing to suicide-lined traits. *Translational Psychiatry* 4:1-7, 2014.

BAUMEISTER, D.; CIUFOLINI, S.; MONDELLI, V. Effects of psychotropic drugs on inflammation: consequence or mediator of therapeutic effects in psychiatric treatment? *Psychopharmacol.* v.233, p.1575-89, 2016.

Schatzberg AF; Nemeroff CB. The American psychiatric publishing textbook of psychopharmacology, 4 ed. 2009.

Magro F, Sousa P, Ministro P. C-reactive protein in Crohn's disease: how informative is it? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* v.28(4), p.393-408, 2014.

Hamdani N, Doukhan R, Kurtlucan O, Tamouza R, Leboyer M. Immunity, inflammation, and bipolar disorder: diagnostic and therapeutic implications. *Curr Psychiatry Rep.* v.15(9):p.387-395, 2013.

Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Da Cruz IB, Schetinger MR, Loro VL. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem.* v.43, p.1118-23, 2010.

Duarte T, da Cruz IB, Barbisan F, Capelleto D, Moresco RN, Duarte MM. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. *Pharmacogenomics J.* v.16(6), p.501-506, 2016.

Machado, A.K., Cadona, F.C.; Azzolin, V.F., Dornelles, E.B., Barbisan, F.; Ribeiro, E.E.; Manica-Cattani, M.F., Duarte, M.M.F., Saldanha, J.R.P. Cruz, I.B.M. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. *Food Res. Intern.* v. 67, p. 426-433, 2015.

Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, Berto MD, Barbisan F, Dornelles EB, Glanzner WG, Gonçalves PB, Bica CG, da Cruz IB. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol. In Vit.* v.32, p.8-15, 2016.

Jung IEC, Machado AK, da Cruz IB, Barbisan F, Azzolin VF, Duarte T, Duarte MM, do Prado-Lima PA, Bochi GV, Scola G, Moresco RN. Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels. *Psychopharmacol.* v. 233, n. 9, p. 1715-1723, 2016.

Morabito C, Rovetta F, Bizzarri M, Mazzoleni G, Fanò G, Mariggiò MA. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic. Biol. Med.* v. 48, p. 579-589, 2010.

Barbisan F, Motta Jde R, Trott A, Azzolin V, Dornelles EB, Marcon M, Algarve TD, Duarte MM, Mostardeiro CP, Unfer TC, Schott KL, da Cruz IB. Methotrexate-related response on

human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *Plos One*. v. 9, n. 10, 2014.

Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev*. v.26(3-4) p..373-400, 2007.

Merly L, Smith SL. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? *Immunopharmacol Immunotoxicol*, v.39(2), p.55-58, 2017.

Montagner GF dos S., Sagrillo M, Machado MM, Almeida RC, Mostardeiro CP, Duarte MM, da Cruz IB. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol In Vitro*. v.24(5), p.1410-6, 2010.

Algarve TD, Barbisan F, Ribeiro EE, Duarte MM, Mânica-Cattani MF, Mostardeiro CP, Lenz AF, da Cruz IB. In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury. *Genet Mol Res*. V.12(4), p.5134-44, 2013.

Capeleto D, Barbisan F, Azzolin V, Dornelles EB, Rogalski F, Teixeira CF, Machado AK, Cadoná FC, da Silva T, Duarte T, Duarte MM, da Cruz IB. The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism. v.16(5), p.621-30, *Biogerontology*, 2015.

Dornelles EB, Goncalves BD, Schott KL, Barbisan F, Unfer TC, Glanzner WG, Machado AK, Cadona FC, Azzolin VF, Montano MA, Griner J, da Cruz IB. Cytotoxic effects of moderate static magnetic field exposure on human periphery blood mononuclear cells are influenced by Val16Ala-MnSOD gene polymorphism. *Environ Sci Pollut Res Int.*, v.24(5), p.5078-5088, 2017.

Schott KL, Assmann CE, Barbisan F, Azzolin VF, Bonadiman B, Duarte MMMF, Machado AK, da Cruz IBM. Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. *Chem Biol Interact*. v.273, p.18-27, 2017.

Chavda N, Kantharia ND, Jaykaran. Effects of fluoxetine and escitalopram on C-reactive protein in patients of depression. *J Pharmacol Pharmacother*. V.2(1), p.11-6, 2011.

Ho T, Pollock BG, Mulsant BH, Schantz O, Devanand DP, Mintzer JE, Porsteinsson AP, Schneider LS, Weintraub D, Yesavage J, Drye LT, Munro CA, Shade DM, Lyketsos C, Bies R. R- and S-citalopram concentrations have differential effects on neuropsychiatric scores in elders with dementia and agitation. *Br J Clin Pharmacol*. v.82(3), p.784-92, 2016.

Dong Y, Yang C, Wang Z, Qin Z, Cao J, Chen Y. The injury of serotonin on intestinal epithelium cell renewal of weaned diarrhoea mice. *Eur J Histochem*. v.60(4):2689, 2016.

Avitsur R, Paley S, Franko M, Wolff N, Eyal N, Doron R. Escitalopram or novel herbal treatments differentially alter cytokine and behavioral responses to immune challenge. *J Neuroimmunol.* v.309, p.111-118, 2017.

Haastrup E, Knorr U, Erikstrup C, Kessing LV, Ullum H. No evidence for an anti-inflammatory effect of escitalopram intervention in healthy individuals with a family history of depression. *J Neuroimmunol.* 2012 Feb 29;243(1-2):69-72

Schmidt C, Leibiger J, Fendt M. The norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine is more potent in treating murine narcoleptic episodes than the serotonin reuptake inhibitor escitalopram. *Behav Brain Res.* 2016 Jul 15;308:205-10

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar *in vitro* a influência de fatores genéticos, nutricionais e da interação farmacológica com antidepressivos na resposta anti-inflamatória do lítio. De um modo geral, os resultados mostraram que a resposta anti-inflamatória pode ser afetada por todos os fatores investigados, potencializando ou atenuando o efeito anti-inflamatório do lítio.

Nossos resultados que serão discutidos podem ser considerados relevantes, uma vez que a literatura apresenta muitas inconsistências relacionadas ação do próprio lítio, ou de outros psicofármacos na modulação inflamatória e oxidativa de pacientes acometidos por depressão e/ou TEBs.

A fim de averiguar o efeito genético do polimorfismo Val16Ala-SOD2 sobre a ação anti-inflamatória do lítio, inicialmente foi necessário conduzir um trabalho, para de fato esclarecer se tal polimorfismo atuava consistentemente no processo inflamatório das CMSP. Cabe lembrar, que esse polimorfismo causa um desequilíbrio basal S-PH e que estudos prévios tem sugerido ser ele um fator que altera o metabolismo inflamatório e também a resposta de CMSP expostas a alguns fármacos ou moléculas bioativas presentes em alimentos (MONTANO et al., 2012; BARBISAN et al., 2014; CAPELETO et al., 2015; DUARTE et al., 2016).

Os resultados descritos no primeiro artigo desta tese, de fato demonstraram que o padrão geral de imunosenescência não foi alterado pelo desequilíbrio de S-PH associado ao polimorfismo Val16Ala-SOD2. No entanto, o desequilíbrio S-PH apresentou uma forte influência na velocidade e intensidade de alguns marcadores de imunosenescência, principalmente nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de estresse oxidativo. Outro resultado relevante, encontrado e descrito no primeiro estudo diz respeito a hiperativação proliferativa das CMSP. A hiperativação observada em nossas culturas pode ser considerada como um processo de imunossescência. Esse fenômeno, foi também influenciado pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2, e nossos resultados sugeriram ser modulado, em algum nível, pelo metabolismo oxidativo. Estando de acordo com o que foi demonstrado previamente por De la Fuente (2008), que discorre sobre o envolvimento de alterações oxidativas do sistema imunológico em processos de envelhecimento. No caso, parece que células portadoras genótipo VV apresentam maiores níveis de S, apresentaram uma tendência a cronificar processos de inflamação e hiperativação proliferativa, quando comparado com células portadoras do genótipo AA, que possuem uma SOD2 mais eficiência, e portanto maiores níveis de HP.

Na cultura de células de 72 horas (passagem zero), as células AA, que têm uma enzima SOD2 mais eficiente, apresentaram uma resposta imune mais rápida e intensa, enquanto que as células VV, que têm menor eficiência de SOD2, apresentaram uma resposta imune mais lenta. Resultados semelhantes já haviam sido descritos em estudos anteriores (MONTAGNER et al., 2010; BARBISAN et al., 2014; WANG et al., 2014). Embora as células AA, sejam mais sensíveis à ativação de PHA, as células VV mantiveram níveis mais elevados de citocinas em todas as passagens aqui analisadas. Investigações *in vitro* e *in vivo* já haviam demonstrado associação entre o genótipos VV e altos níveis de citocinas inflamatórias (CAPELETO et al., 2015; DUARTE et al., 2016).

Assim, todos os resultados sugeriram que o desequilíbrio basal S-PH teve impacto na modulação de alguns aspectos da imunossenescência, embora o padrão geral desse processo de envelhecimento imune desencadeado pela ativação de PHA tenha sido conservador. Neste caso, os dois genótipos homozigóticos de SOD2 que estão desequilibrados parecem ter um impacto negativo na resposta imune: enquanto o genótipo de alta eficiência de SOD2 (AA) produziu níveis mais altos de marcadores de estresse oxidativo, o genótipo de baixa eficiência catalítica VV, produziu níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias do que Células AV.

Portanto, o primeiro estudo corroborou investigações pregressas que sugeriram que o desbalanço genético S-HP causado pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2, poderia ser um elemento que influencia na resposta anti-inflamatória do Lítio. Esse estudo também está apoiado em outras investigações conduzidas com seres humanos e realizadas por grupos de pesquisa independentes. Por exemplo, Isbir e colaboradores (2008), investigaram o efeito de Val16Ala-SOD2 nos níveis de citocinas pró-inflamatórias de pacientes submetidos a cirurgia de revascularização do miocárdio com circulação extracorpórea. Embora os autores não tenham mostrado diferenças nos níveis basais de IL-6 em pacientes portadores dos diferentes genótipos, a análise pós-operatória mostrou que os pacientes portadores do alelo V (VV e AV) apresentaram níveis de IL-6 mais elevados do que os pacientes com alelo V ausente, ou seja, genótipo AA. Demonstrando que Val16Ala-SOD2 poderia influenciar a modulação inflamatória.

Paludo e colaboradores (2014), também descreveram modulação diferencial polimorfismo na produção de EROs intracelulares por CMSP com e sem indução de inflamação. Esses estudos, reforçam a sugestão de que o desequilíbrio REDOX, especialmente envolvendo os níveis S e PH, pode influenciar a resposta inflamatória.

A partir dos achados do primeiro trabalho, o segundo estudo foi realizado no qual, buscamos avaliar o impacto do desbalanço S-PH em células tratadas com lítio nos níveis da enzima GSK-3 $\beta$ . Antes de discutirmos mais profundamente os resultados obtidos, cabe salientar que a influência do polimorfismo Val16Ala-SOD2 no efeito anti-inflamatório do Lítio é plausível, já que o ânion S tem um papel bem estabelecido na resposta inflamatória.

No processo inflamatório, a presença de um antígeno ou lesão, níveis altos de S são produzidos por NAD (P) H oxidases encontradas em todos os tipos de células que participam de inflamação (leucócitos, células endoteliais e outras células vasculares, etc.). Concomitantemente, os níveis de ON também são elevados em células imunes ativadas, especialmente macrófagos. Ambos, S e ON exercem seu efeito na resposta inflamatória por múltiplos mecanismos, induzindo também níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e um estado proliferativo de macrófagos imunes (GUZIK et al., 2003).

Estudos anteriores envolvendo a enzima GSK-3 $\beta$  e modulação S e PH ainda são incipientes, Por este motivo é que, denominamos aqui os macrófagos da linhagem celular RAW 264.7 expostos ou ao paraquat ou a porfirina, como como células VV-like, ou AA-like, respectivamente. Nossos dados mostraram que o efeito anti-inflamatório do Lítio foi atenuado tanto nas células VV quanto nas células VV-like produzidas a partir da exposição prévia ao paraquat, que gera níveis elevados do ânion S. É relevante comentar que, a realização do ensaio com macrófagos de linhagem se justifica, porque ao utilizarmos, excluímos todos os demais polimorfismos genéticos, e ainda excluímos a interferência da alimentação, fatores emocionais e de estilo de vida. Além disto, esse modelo farmacológico S-PH, foi desenvolvido e previamente validado pelo nosso grupo de pesquisa a partir de estudos de Berto et al (2015) e Azzolin et al (2016), que utilizaram respectivamente linhagens celulares de câncer de próstata e coloretal, respectivamente, ambas expostas ao paraquat e porfirina.

Os resultados deste estudo repetiram descrições prévias, sugerindo que células AA tenham uma resposta anti-inflamatória mais intensa. Entretanto, ainda não havia sido investigado o efeito deste genótipo na modulação da enzima GSK-3 $\beta$ . Nossos resultados demonstram que justamente nas células AA ocorreu a maior queda nos níveis gênicos e proteicos da GSK-3 $\beta$ , e maior diminuição da taxa de proliferação celular em 72 horas, quando expostas ao Lítio. Resultados muito semelhantes foram encontrados para os macrófagos tratados com paraquat e porfirina em associação com o lítio. Já, as células VV que apresentam níveis de S mais altos apresentaram uma resposta anti-inflamatória mais tênue quando expostas ao lítio. Estes resultados estão consonância com o estudo do tipo ensaio clínico realizado por Duarte et al.,

(2016), que mostrou que pacientes hipercolesterolêmicos portadores do genótipo VV eram mais resistentes ao tratamento a rosuvastatina e a seus efeitos anti-inflamatórios do que os pacientes portadores do alelo A.

Acreditamos, que nossos achados sejam relevantes uma vez que, o Lítio é utilizado no tratamento farmacológico dos TEBs, desde 1960, permanecendo como a principal medicação estabilizadora de humor, até os dias atuais. Apesar, da importância terapêutica do Lítio, um número considerável de pacientes não responde ou tolera o tratamento (GITLIN, 2016), não havendo uma causa específica para essa divergência de resposta terapêutica, é plausível de se pensar que o efeito diferencial de Lítio em alguns pacientes psiquiátricos poderia ocorrer por influência farmacogenética (GITLIN, 2016). Entretanto, estudos complementares *in vivo* precisam ser conduzidos para avaliar o quanto o polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderia realmente impactar a ação farmacológica anti-inflamatória e nos sintomas de pacientes psiquiátricos tratados com este fármaco.

Uma grande quantidade de evidências têm sugerido que moléculas bioativas presentes nos alimentos possuem efeito anti-inflamatório e antioxidante, e portanto, as mesmas também poderiam influenciar a resposta farmacológica ao lítio. Entretanto, a investigação de fatores dietéticos é bastante árdua e envolve uma grande quantidade de variáveis. A opção por macrófagos e não células cerebrais, é justificada pelo fato de: (1) o Lítio agir diretamente na cascata inflamatória, inibindo a GSK-3 $\beta$ ; (2) esta linhagem vem sendo utilizada frequentemente em estudos inflamatórios, (3) quando um fármaco é ingerido ele age não somente em um tecido, mas em todas as estruturas que apresentem receptores com afinidade.

Dentro dos fatores nutricionais, decidimos avaliar o efeito da cafeína, catequina e teobromina, biomoléculas presentes em bebidas cafeinadas como Chá-verde, Café, Chá-Preto, Erva-Mate e Guaraná, bebidas essas consumidas, diariamente pela maioria da população mundial (LENZ, 2014). Assim, no terceiro trabalho investigamos os efeitos da interação potencial entre Lítio e uma mistura de Xantina-Catequina (XC) em baixíssimas concentrações, nas respostas oxidativa e inflamatórias de macrófagos. Em geral, os resultados indicaram uma interação ativa, intensificando os efeitos anti-inflamatórios de Lítio, já descritos na literatura (ROSENBLAT e MCINTYRE, 2016).

Inicialmente, nos avaliamos isoladamente os efeitos da cafeína, teobromina e catequina na proliferação celular dos macrófagos. No entanto, os efeitos das moléculas isoladas não foram suficientemente potentes para justificar a investigação adicional, diferente do efeito sinérgico de tais biomoléculas. Além disso, e como já comentado anteriormente, bebidas popularmente

consumidas, geralmente contêm as três biomoléculas, então, nada mais justo do que estudarmos os efeitos da tríade (CHANDRA et al., 2004; WANG et al., 2009; MARQUES et al., 2016).

Gomez-Pinilla e Nguyen (2012), comentaram que os polifenóis, incluindo catequinas, encontrados nas plantas, podem afetar uma ampla gama de mecanismos no cérebro e ajudar na manutenção da cognição e da saúde mental. Portanto, o consumo de dietas enriquecidas com polifenóis pode ser uma opção terapêutica barata em pacientes psiquiátricos. Por outro lado, a evidência indicou que o consumo elevado de cafeína está associado a várias manifestações psiquiátricas em pacientes com humor e sintomas psicóticos (MESTER et al., 1995; WANG et al., 2015). Portanto, a ingestão de cafeína, ou compostos que a contenham, por esses pacientes deve ser avaliada cuidadosamente na prática clínica. De fato, o consumo excessivo de café pode exacerbar sintomas de TEBs, inclusive afetando as concentrações do Lítio no sangue como demonstrado por Mester e colaboradores (1995), entretanto vale ressaltar, que a quantidade de cafeína consumida pelos participantes desse estudo variava entre 100 – 300 mg/ dia, uma quantidade consideravelmente maior (cerca de 100 mil vezes), que as 25µG/mL utilizadas no nosso estudo.

Em relação as catequinas, essas moléculas têm reconhecida e comprovada ação anti-inflamatória (SHAY et al., 2015; BAO e PENG, 2015; FAN et al., 2017), e, não encontramos nenhum estudo até o momento que demonstre efeitos negativos destas ao organismo humano. Nesse contexto, a catequina mostra-se como promissora, como possível complemento terapêutico ao tratamento dos TEBs com Lítio.

Loftis e colaboradores (2016), em um estudo de 8 semanas, randomizado, controlado por placebo, avaliaram o efeito da suplementação diária com epigallocatequina- galato, (um tipo de catequina), versus placebo em pacientes com SCZ, transtorno esquizoafetivo ou TEBs. Em ambos os grupos, os pacientes seguiram com suas medicações. Os resultados não mostraram diferenças nos sintomas psiquiátricos entre os 2 grupos. Quanto as citocinas inflamatórias avaliadas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-9), houve uma tendência a queda, entretanto os valores não foram significativos no grupo que recebeu epigallocatequina. No entanto, é importante comentar que nesse estudo o tamanho da amostra foi de 25 pacientes no total, número inferior ao que é recomendado para estudo com fármacos, entre 40 e 100 pacientes (STERN et al., 1997). Um outra limitação metodológica do estudo desenvolvido por Loftis e colaboradores, é que no grupo de pacientes, os indivíduos, apresentavam diferentes transtornos e conseqüentemente, estavam fazendo uso de diferentes dosagens e fármacos, assim os resultados podem não corresponder a realidade.



Existe um interesse considerável em tratamentos complementares para TEBs e outros transtornos, uma vez que muitos pacientes não respondem como o esperado. O uso de anti-inflamatórios, naturais como catequinas, como tratamento complementar não deve ser descartado, entretanto mais estudos precisam ser realizados para comprovação da sua eficácia.

Kang e colaboradores (2017), utilizaram a pentoxifilina (um fármaco derivado de xantinas incluindo a teobromina), um vasodilatador, para avaliar seu efeito preventivo ao dano oxidativo e marcadores inflamatório em ratos tratados com pilocarpina e Lítio. Os resultados mostraram efeito benéfico da pentoxifilina em todos os parâmetros analisados, e sugerem o uso desse derivado da teobromina, em paciente epiléticos.

Assim, os resultados aqui descritos indicaram que a interação entre Lítio e baixas concentrações de compostos de mistura de XC intensificam a resposta anti-inflamatória em macrófagos. Estes resultados são potencialmente úteis para pacientes com TEBs e outros transtornos, uma vez que o consumo controlado de baixas doses das biomoléculas, poderia potencializar o efeito terapêutico do lítio na rota inflamatória. Entretanto, estudos em animais e ensaios clínicos precisam ser realizados para confirmação de tal hipótese.

Por fim, a presente tese também investigou no seu último estudo se o efeito anti-inflamatório do Lítio poderia ser influenciado pelos fármacos antidepressivos Imipramina, Nortriptilina, Fluoxetina e Escitalopram. A associação entre Lítio e antidepressivos, é utilizada para transtornos do espectro bipolar principalmente, objetivando evitar viradas maníacas. A totalidade dos resultados avaliados, considerando os valores do índice inflamatório (IF) desenvolvido, sugeriu que o Lítio teve seu efeito anti-inflamatório potencializado pela Imipramina, Nortriptilina e Fluoxetina. Já a interação com Escitalopram parece ter efeito pró-inflamatório.

Uma vez que a análise desses resultados se mostrou bastante complexa, já que haviam muitos dados de marcadores inflamatórios e oxidativos, optamos por desenvolver um IF, a fim de facilitar a compreensão das informações obtidas nos experimentos. O IF, foi construído a partir do somatório geral do percentual em relação ao controle negativo de seis variáveis pró-inflamatórias e oxidativas divididas pelo percentual em relação ao controle de da citocina anti-inflamatória IL-10 x 6 (número de variáveis pró-inflamatórias).

Para validar o índice foi conduzido um estudo paralelo com indivíduos, que realizaram exames laboratoriais a fim de avaliar a presença de inflamação, onde além das citocinas investigadas, também foram avaliados os níveis da PCR. Os resultados do estudo *in vivo*,

mostraram uma área sobre a curva calculada *roc* AUC > 0,8 indicando precisão e previsibilidade do nosso IF, como marcador do estado inflamatório de pacientes.

Neste último trabalho, no protocolo *in vitro*, a ativação dos macrófagos foi confirmada pelo uso do antígeno PHA (controle positivo), que desencadeou resposta inflamatória, estresse oxidativo, proliferação celular, regulação positiva de genes de citocinas pró-inflamatórias e regulação negativa do gene IL-10 (uma interleucina anti-inflamatória), assim as células PHA, apresentaram os maiores valores do IF (> 2,5) quando comparados com as células não tratadas, ou tratadas com Lítio isoladamente ou em associação com os antidepressivos. Como os resultados observados a partir da proliferação celular e modulação de genes foram heterogêneos, resolvemos não incluir essas variáveis na equação do IF e apenas usá-los para confirmar o estado inflamatório de macrófagos. Além disso, o uso desses dados tornaria impossível validar dados de IF *in vitro* por análises semelhantes em seres humanos, ou seja *in vivo*.

Nesse estudo, testamos os efeitos do lítio em macrófagos não ativados e observamos resultados semelhantes aos apresentados pelas células não-tratadas. Em associação com antidepressivos, o Lítio foi capaz de reverter padrões inflamatórios leves, dependendo do tipo de droga antidepressiva, que estava sendo utilizada concomitantemente, com ação não anti-inflamatória apenas na associação com o Escitalopram.

Em relação aos valores de IF, isoladamente, o tratamento com os fármacos Imipramina, Nortriptilina e Fluoxetina, não eram tão elevados, mesmo assim a interação com Lítio apresentou efeito anti-inflamatório, sugerindo que o uso concomitante desses fármacos seria positivo em termos de metabolismo inflamatório.

No entanto, parece que tais efeitos não são universais na classe dos antidepressivos, uma vez observamos um efeito proinflamatório quando as células foram tratadas com Lítio em associação com Escitalopram. Dong e colaboradores (2016), avaliaram o efeito do Escitalopram sobre os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 em camundongos com condição inflamatória induzida por administração de LPS. Os autores relataram que o fármaco teve efeitos anti-inflamatórios e antidepressivos em camundongos nos camundongos, sugerindo que o sistema serotoninérgico desempenha um papel crucial na fisiopatologia da depressão induzida por inflamação. Por outro lado, um estudo recente realizado por Avitsur et al., (2017) descreveu resultados contrários relacionados à ação do Escitalopram sobre a inflamação induzida por LPS em camundongos. Neste estudo, o fármaco aumentou a secreção de TNF- $\alpha$  e induziu aumento de IL-1 $\beta$  indicando um efeito proinflamatório. Considerando os estudos clínicos em humanos,

é interessante comentarmos, os resultados de uma investigação que avaliou o efeito de uma única dose diária de 10 mg de Escitalopram ou placebo durante quatro semanas em pacientes com depressão na modulação de citocinas. Os resultados não mostraram diferenças nos níveis de citocinas entre os indivíduos que receberam Escitalopram ou placebo, sugerindo que não existe um efeito inflamatório global do Escitalopram (HAASTRUP et al., 2012).

Investigações com pacientes, também descreveram que o efeito imune de alguns antidepressivos, como Escitalopram e Nortriptilina, poderia ser dependente dos marcadores inflamatórios basais. Os pacientes com níveis mais elevados de PCR, IL-6 e TNF- $\alpha$  mostraram resistência ao tratamento (SCHMIDT et al., 2016). Portanto, até então, os dados dos efeitos do Escitalopram sobre a modulação inflamatória são bastante confusos. Desta forma, nossos resultados que mostram ação pró-inflamatória da interação Lítio e Escitalopram não podem ser descartados e merecem investigações complementares *in vivo*. De todo modo, a análise realizada corroborou a hipótese de que o efeito anti-inflamatório do Lítio poderia ser diferencialmente modulado conforme o fármaco antidepressivo utilizado em associação.

Em síntese, o conjunto dos resultados confirmou que o lítio possui um importante efeito anti-inflamatório, mas que esse efeito não é universal e não se sobrepõe a potenciais influências genéticas, nutricionais e farmacológicas. Assim, apesar das limitações metodológicas relacionadas aos estudos *in vitro*, estes resultados podem ser relevantes para a clínica psiquiátrica.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados a partir da realização desse estudo nossas conclusões são que:

- o desbalanço S-HP associado ao polimorfismo Val16Ala-SOD2 impacta a resposta inflamatória das células imunológicas, que é mais intensa nas células portadoras do genótipo AA e mais cronicada nas células portadoras do genótipo VV. Esta alteração no metabolismo oxidativo basal e na resposta inflamatória causada por tal polimorfismo afetou o efeito anti-inflamatório do Lítio via modulação da enzima GSK-3 $\beta$ . No caso, células VV- apresentaram resposta anti-inflamatória mais atenuada e níveis menores da inibição da expressão gênica e proteica desta enzima;

- a exposição a xantinas e ou catequinas presentes em bebidas diariamente consumidas pela extensa maioria da população mundial também afetou a resposta anti-inflamatória do lítio. Entretanto, a presença concomitante de xantinas e catequinas em baixas concentrações, intensificou a resposta anti-inflamatória do lítio via diminuição nos níveis de citocinas proinflamatórias e marcadores do oxidativos. Os resultados sugeriram que o consumo de baixas concentrações de cafeína em associação com outras moléculas bioativas, como as catequinas poderia ser seguro em pacientes farmacologicamente tratados com lítio.

- Avaliação da influência *in vitro* da exposição a antidepressivos (Imipramina, Nortriptilina, Fluoxetina, Escitalopram) na resposta anti-inflamatória e na modulação de marcadores oxidativos pelo associada ao lítio utilizando macrófagos RAW 264.7 como modelo experimental mostrou um leve aumento na ação anti-inflamatória quando Lítio e Fluoxetina ou Lítio e Imipramina foram concomitantemente utilizados. Por outro lado, a associação entre Lítio e Escitalopram desencadeou uma resposta proinflamatória nos macrófagos.

O conjunto dos resultados sugere que a ação anti-inflamatória do Lítio não é universal, uma vez que ela pode ser influenciada por fatores genéticos, nutricionais e mesmo pela interação com fármacos antidepressivos utilizados na clínica psiquiátrica para tratar pacientes com depressão maior ou portadores de TEBs.

## 7 REFERÊNCIAS

ACKENHEIL, M. **Neurotransmitters and signal transduction processes in bipolar affective disorders: a synopsis.** J. Affect. Disord. v. 62, p. 101-111, 2001.

**Activation of IL-1 beta and IL-18 by Canonical Inflammasome Pathway.** Disponível em: <<http://www.arigobio.com/news/view/62>>. Acesso em: 09 jul. 2016.

AGUIAR, C. C. et al. **Drogas antidepressivas.** Acta Med. Port. v. 24, p. 91-98, 2011.

AKYOL, O. et al. **Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia.** Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. v. 29, p. 123-131, 2005.

ALCOCER-GÓMEZ, E. et al. **NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder.** Brain, Behav. Immun. v.36, p.111-117, 2014.

ALDA, M. **Lithium in the treatment of bipolar disorder: pharmacology and pharmacogenetics.** Mol. Psychiatry. v. 20, n. 6, p. 661-670, 2015.

ALGARVE, T.D. et al. **In vitro effects of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism on human white blood cells exposed to methylmercury.** Genet Mol Res. v.12, p. 5134-5144, 2013.

AKYOL O. et al. **Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. v.29, p.123-131, 2005.

AMBROSONE, C.B. et al. **Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer.** Cancer Res. v.59, p.602-606, 1999.

ANDERSON, G. **Linking the biological underpinnings of depression: Role of mitochondria interactions with melatonin, inflammation, sirtuins, tryptophan catabolites, DNA repair and oxidative and nitrosative stress, with consequences for classification and cognition.** Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2017.

ANDERSON, G; MAES, M. **Oxidative/nitrosative stress and immuno-inflammatory pathways in depression: treatment implications.** Curr. Pharm. Des. v.20, n.23, p.3812-3847, 2014.

ARAL, H.; VECCHIO-SADUS, A. **Toxicity of lithium to humans and the environment 261 a literature review.** Ecotoxicol. Environ. Saf. v.70, p.349-356, 2008.

ASHAFAQ, M. et al. **Catechin hydrate ameliorates redox imbalance and limits inflammatory response in focal cerebral ischemia.** Neurochem. Res. v. 37, p. 1747-1760, 2012.

AVITSUR, R. et al. **Escitalopram or novel herbal treatments differentially alter cytokine and behavioral responses to immune challenge.** J. Neuroimmunol. v.309, p.111-118, 2017.

AZZOLIN, V.F. et al. **Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response.** Toxicol. In Vit. v.32, p.8-15, 2016.

BAGGOTT, M. J. et al. **Psychopharmacology of theobromine in healthy volunteers.** Psychopharmacol. (Berl). v. 228, n. 1, p. 109-118, 2013.

BAGOT, R. C. et al. **Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression.** Dialogues Clin. Neurosci. v. 16, p. 281-295, 2014.

BAO, H.; PENG, A. **The Green Tea Polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and its beneficial roles in chronic kidney disease.** J. Transl. Int. Med. 2016

BARBISAN, F. **Efeito farmacogenético e farmacogenômico do metotrexato na resposta citotóxica de células mononucleares periféricas do sangue.** 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) -Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

BARBISAN, F. et al. **Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism.** Plos One. v. 9, n. 10, 2014.

BARBOSA, K. B. F. et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Rev Nutr. v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BASILE, A. et al. **Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart.** J. Ethnopharmacol. v. 102, p. 32-36, 2005.

BAUMEISTER, D.; CIUFOLINI, S.; MONDELLI, V. **Effects of psychotropic drugs on inflammation: consequence or mediator of therapeutic effects in psychiatric treatment?** Psychopharmacol. v.233, p.1575-89, 2016.

BAXTER, J. A. **Global epidemiology of mental disorders: what are we missing?** Plos One. v. 8, n. 6, 2013.

BERTO, M.D. et al. **The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis.** Med Oncol. v.32, n.11, p.:251-259, 2015.

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

BEUREL, E. **Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases.** Front. Mol. Neurosci. v. 31, p. 4-18, 2011.

BEUREL, E.; JOPE, R. S. **Inflammation and lithium: clues to mechanisms contributing to suicide-lined traits.** *Translat. Psychiatr.* v. 4, p. 1-7, 2014.

BIAN, Q. et al. **The effect of typical antipsychotics, perospiridone, ziprazidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon-gamma.** *Progr. NeuroPsychopharmacol. Biolog. Psychiatr.* v. 32, p. 42-48, 2008.

BICA, C.G. et al. **MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer.** *Pathol Oncol Res.*v.15, p.19-24, 2009.

BIRKENHÄGER, T.K. et al. **Comparison of the effectiveness of two treatment strategies in inpatients with a depressive disorder. A double-blind study of imipramine followed by lithium addition versus fluvoxamine followed by lithium addition.** *Tijdschr Psychiatr.* v.48, n.4, p.271-81, 2006.

BITENCOURT, L.S. et al. **The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside.** *Food Chem Toxicol.* v. 53, p.119–125, 2013.

BLASI, G. et al. **Changes in prefrontal and amygdala activity during olanzapine treatment in schizophrenia.** *Psychiatry Res.* v. 173, n. 1, p. 31-38, 2009.

BOCCHETTA, R. et al. **Duration of lithium treatment is a risk factor for reduced glomerular function: a cross- sectional study.** *BMC Med.* v.11, p.11–33, 2013.

BRAMBILLA, P. et al. **Increased M1/decreased M2 signature and signs of Th1/Th2 shift in chronic patients with bipolar disorder, but not in those with schizophrenia.** *Transl. Psychiatr.* v. 406, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). **Diretrizes assistenciais em saúde mental na saúde suplementar.** Rio de Janeiro: ANS, 2008. 63 p.

BRASIL, M. A. et al. **Depressão Unipolar: Diagnóstico.** Diretrizes Clínicas na saúde suplementar. Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Suplementar, 2011. Disponível em: <[http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/depressao\\_unipolar-diagnostico.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/depressao_unipolar-diagnostico.pdf)>. Acesso em: 27 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Cadernos de Atenção Básica, nº 34: Saúde Mental.** Brasília: Editora MS, 2013. 176 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME.** 9. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 228 p.

BRESCIANI, G. et al. **The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors.** *Free Radic Res.*v.47, n.10, p.781-792, 2013.

- BRINHOLI, F. F. et al. **Clozapine and olanzapine are better antioxidants than haloperidol, quetiapine, risperidone and ziprasidone *in vitro* models.** Biomed. Pharmacother. v. 81, p. 411-415, 2016.
- BROMET, E. et al. **Cross-national epidemiology of DSM-V major depressive episode.** BMC Medicine. v. 9, n. 90, 2011.
- BROWN, N.C. et al. **An updated meta-analysis of oxidative stress markers in bipolar disorder.** Psychiatry Res.v.218, p.61-68, 2014.
- BRUINSMA, K.; TAREN, D. L. **Chocolate: food or drug?** J. Am. Diet. Assoc. v. 89, p. 1249-1256, 1999.
- BRÛNE, B. et al. **Redox control of inflammation in macrophages.** Antioxid. Redox. Signal. v. 19, n. 6, p. 595-637, 2013.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2010. 1844 p.
- BRYLEVA, E. Y.; BRUNDIN, E. **Kynurenine pathway metabolites and suicidality.** Neuropharmacol. 2017.
- CABRAL, H.R.; NOVAK, I.T. **Autologous rosette formation by human blood monocyte-derived macrophages and lymphocytes.** Am. J. Hematol. v.60, n.4, p.285-288, 1999.
- CADONA, F.C. et al. **Guaraná, a Highly Caffeinated Food, Presents *in vitro* Antitumor Activity in Colorectal and Breast Cancer Cell Lines by Inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPKs Pathways.** Nutr. Cancer. 2017.
- CADONA, F.C. et al. **Guaraná a richest caffeine food increase oxaliplatin sensitivity of colorectal HT-29 cells by apoptosis pathway modulation.** Anticancer Agents Med. Chem. 2015.
- CAMPOS, M.P. et al. **Cancer-related fatigue: a review.** Rev. Assoc. Med. Bras. v.57, p.211-219, 2011.
- CAN, A.; SCHULZE, T.G.; GOULD, TD. **Molecular actions and clinical pharmacogenetics of lithium therapy.** Pharmacol. Biochem. Behav. 2014
- CANETTA, S. et al. **Elevated maternal C-reactive protein is associated with increased risk of schizophrenia in a national birth cohort.** Am. J. Psychiatry. v. 171, n. 9, p. 960-968, 2014.
- CAPELETO, D. et al. **The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism.** Biogerontol. v.16, n.5, p.621-630, 2015.
- CAPPELLETTI, S. et al. **Caffeine: Cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug?** Current Neuropharmacol. v. 13, p. 71-88, 2015.



CARLBORG, A. et al. **Suicide in schizophrenia.** Expert Rev. Neurother. v. 10, n. 7, p. 1153-1164, 2010.

CATALGOL, B. K.; OZDEN, S.; ALPERTUNGA, B. **Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes.** Toxicol. in Vit. v. 21, p. 1538-1544, 2007.

CHANDRA, S.; DE MEJIA GONZALEZ, E. **Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of Ardisia compressa in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas.** J. Agric. Food. Chem. v.52, n.11, 2004.

CHEN, D. et al. **A review of DNA methylation in depression.** J Clin Neurosci. 2017.

CHEN, H. et al. **Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease.** Mol. Cell. Biochem. v. 363, n.1-2, p.85-91, 2012.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. **Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed.** J. Neuroinflam. v. 11, p. 98-104, 2014.

CHIAPPONI, C. et al. **GABA system in schizophrenia and mood disorders: A mini review on third-generation imaging studies.** Front. Psychiatry. v. 19, 2016.

CHIU, C. T. et al. **Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder.** Pharmacol. Rev. v. 65, p. 105-142, 2013.

CHOU, Y. H. et al. **Association between the serotonin transporter and cytokines: Implications for the pathophysiology of bipolar disorder.** J. Affect. Disord. v. 191, p. 29-35, 2016.

CHOURBAJI, S. et al. **IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors.** Neurobiol. Dis. v. 23, p. 587-594, 2006.

COLLAZIOL, D. et al. **Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing.** Mech. Ageing Dev. v.125, n.3, p. 219-227, 2004.

CORRELL, C. U. et al. **Effects of antipsychotics, antidepressants and mood stabilizers on risk for physical diseases in people with schizophrenia, depression and bipolar disorder.** World Psychiat. v. 14, p. 119-136, 2015.

CROSSLEY, N. A.; BAUER, M. **Acceleration and augmentation of antidepressants with lithium for depressive disorders: two meta-analyses of randomized, placebo controlled trials.** J. Clin. Psychiatry. v. 68, p. 935-940, 2007.

CRUVINEL, W. M. et al. **Sistema imunitário: Parte I-Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** Rev. Bras. Reumatol. v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CUERDA, C. et al. **The effects of second-generation antipsychotics on food intake, resting energy expenditure and physical activity.** Eur. J. Clin. Nutr. v. 68, p. 146-152, 2014.

CUI, J. et al. **Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate.** Neurosc. v. 144, p. 1447-1453, 2007.

CZARNY, P. et al. **Elevated level of DNA damage and impaired repair of oxidative DNA damage in patients with recurrent depressive disorder.** Med. Sci. Monit. v.21, p.412-418, 2015.

DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. **Guarana powder polysaccharides: characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction.** Food. Chem. v. 134, n. 4, p. 1804-1812, 2012.

DANTZER, R. et al. **From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain.** Nat. Ver. Neurosc. v.9, p.46-56, 2008.

DARGÉL, A. A. et al. **C-reactive protein alterations in bipolar disorder: A meta-analysis.** J. Clinic. Psychiatr. v. 76, p. 142-150, 2015.

DAVALIEVA, K.; MALEVA, K. I.; DWORK, A. J. **Proteomics research in schizophrenia.** Front. Cell. Neurosci. v. 16, p. 10-18, 2016.

DELL'OSSO, M. C. et al. **Inflammatory and neurodegenerative pathways in depression: A new avenue for antidepressant development?** Current. Medic. Chem. v. 18, p. 245-255, 2011.

DE LA FUENTE, M. **Role of neuroimmunomodulation in aging.** Neuroimmunomodulation. v.15, n.4-6, p.213-223, 2008.

DE SOUSA, R. T. **Fisiopatologia do transtorno bipolar e efeito do tratamento com lítio: Efeito na neuroproteção e função mitocondrial.** 2014. 120f. Tese (Doutorado em Psiquiatria) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

DESPOTOVIC, M. et al. **Gene polymorphisms of tumor necrosis factor alpha and antioxidant enzymes in bronchial asthma.** Adv. Clin. Exp. Med. v.24, n.2, p.251-256, 2015.

DE VASCONCELLOS, A. P. S. et al. **Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress.** Neurochem. Res. v. 31, p. 1141-1151, 2006.

DIETRICH-MUSZALSKA, A. et al. **Epicatechin inhibits human plasma lipid peroxidation caused by haloperidol in vitro.** Neurochem. Res. v. 37, p. 557-562, 2012.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; OLAS, B.; RABE-JABLONSKA, J. **Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients.** Platel. v. 16, p. 386-391, 2005.

DIETRICH-MUSZALSKA, A.; RABE-JABLONSKA, J.; ZGIRSKI, A. **The effects of olanzapine (Zolafren) on lipid peroxidation in human blood platelets and plasma: *in vitro* studies.** Psychiatr. Psychol. Clinic. v. 4, p. 13-19, 2004.

DI NICOLA, M. et al. **Serum and gene expression profile of cytokines in first-episode psychosis.** Brain. Behav. Immun. v. 31, p. 90-95, 2013.

DISNER, S. G. et al. **Neural mechanisms of the cognitive model of depression.** Nat. Rev. Neurosc. v. 12, 2011.

DONG, C. et al. **Effects of escitalopram, R-citalopram, and reboxetine on serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-10, and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration.** Pharmacol. Biochem. Behav. v.144, p.7-12, 2016.

DORNELLES, E.B. et al. **Cytotoxic effects of moderate static magnetic field exposure on human periphery blood mononuclear cells are influenced by Val16Ala-MnSOD gene polymorphism.** Environ. Sci. Pollut. Res. Int. v.24, n.5, p.5078-5088, 2017.

DUARTE, M.M. et al. **Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism.** Clin. Biochem. v.43, n.13-14, p.1118-1123, 2010.

DUFF, Y. A. et al. **A consecutive series of treated affected offspring of parents with bipolar disorder: is response associated with the clinical profile?** Can. J. Psychiatry. v.52, p.369-76, 2007.

EFTEKHARI, A. et al. **Involvement of oxidative stress and mitochondrial/lysosomal cross-talk in olanzapine cytotoxicity in freshly isolated rat hepatocytes.** Xenob. v. 46, n. 4, p. 369-378, 2016.

ELSAYED, M.; MAGISTRETTI, P. J. A. **New outlook on mental illnesses: Glial involvement beyond the glue.** Front. Cell. Neurosci. v. 9, 2015.

EMILIANI, F. E. et al. **Oxidative stress and schizophrenia: recent breakthroughs from an old story.** Curr. Opin. Psychiatry. v. 27, n. 3, p. 185-190, 2014.

FAN, F.Y.; SANG, L.X.; JIANG, M. **Catechins and Their Therapeutic Benefits to Inflammatory Bowel Disease.** Molecules. v.19, p.22-33, 2017.

FAOUR-NMARNE, C.; AZAB, A. N. **Effects of olanzapine on LPS-induced inflammation in rat primary glia cells.** Inn. Immun. v. 22, p. 40-50, 2016.

FERRARI, A. J. et al. **A systematic review of the global distribution and availability of prevalence data for bipolar disorder.** J. Affect. Disorders. v. 134, p. 1-13, 2011.

FERREIRA, A. I. S. **Esquizofrenia e análises forenses desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de fármacos psicotrópicos por LC-MS/MS.** Dissertação (Mestrado em Química Forense) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

FLATOW, J. et al. **Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia.** *Biol. Psychiatry.* v. 74, n. 6, p. 400-409, 2013.

FONSECA, M. et al. **An open trial of adjunctive escitalopram in bipolar depression.** *J. Clin. Psychiatry.* v.67, n.1, p.81-86, 2006.

FRANCESCHI, C. et al. **Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.** *Ann. N. York Acad. Sci.* v.908, p.244–254, 2000.

FREY, B. N. et al. **Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report.** *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* v. 31, p. 283-285, 2007.

FRIES, G. R. et al. **Hypothalamicpituitary-adrenal axis dysfunction and illness progression in bipolar disorder.** *Int. J. of Neuropsychop.* v. 18, 2014.

FULGONI, V. L.; KEAST, D. R.; LIEBERMAN, H. R. **Trends in intake and sources of caffeine in the diets of US adults: 2001–2010.** *Am. J. Clin. Nutr.* v. 101, p. 1081-1087, 2015.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. **Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier.** *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2016.

GARDNER, A.; BOLES, R.G. **Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders.** *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*v.35, n.3, p.730-743, 2011.

GERAETS, L. et al. **Caffeine metabolites are inhibitors of the nuclear enzyme poly (ADP-ribose) polymerase-1 at physiological concentrations.** *Biochem. Pharmacol.* v. 72, p. 902-910, 2006.

GITLIN, M. **Lithium side effects and toxicity: prevalence and management strategies.** *Int. J. Bipolar Disord.* v.4, n.1, 27-41, 2016.

GLYNN, A.S. et al. **A mitochondrial target sequence polymorphism in manganese superoxide dismutase predicts inferior survival in breast cancer patients treated with cyclophosphamide.** *Clin. Cancer Res.* v.15, n.12, p.4165-4173, 2009.

GOODWIN, G. M. et al. **ECNP consensus meeting. Bipolar depression.** *Eur. Neurol.* v. 18, p. 535-549, 2008.

GOTTLIEB, M.G. et al. **Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population.** *Genet. Mol. Res.* v.4, n.4, v. 691-703, 2005.

GOULD, T. D.; MANJI, H. K. **Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders.** *J. Psychos. Res.* v. 53, p. 687-697, 2002.

GREEN, H. F.; NOLAN, Y. M. **GSK-3 mediates the release of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 from cortical glia.** *Neurochem. Int.* v. 61, p. 666-671, 2012.

GROF, P. et al. **Is response to prophylactic lithium a familial trait?** J. Clin. Psychiatry. v.6, p.942–947, 2002.

GUTTUSO, T. Jr. **Low-dose lithium adjunct therapy associated with reduced off-time in Parkinson's disease: A case series.** J Neurol Sci. v.368, p.221-222, 2016.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. **Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.** J. Physiol. Pharmacol. v.54, n.4, p.469-487, 2003.

HAASTRUP, E. et al. **No evidence for an anti-inflammatory effect of escitalopram intervention in healthy individuals with a family history of depression.** J. Neuroimmunol. v.243, n.1-2, p.69-72, 2012.

HALLIWELL, B. **Biochemistry of oxidative stress.** Biochem. Soc. Transact. v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HAMMOND, E.N.; VANGU, M.D. **Effect of adjuvant lithium on thyroxine (T4) concentration after radioactive iodine therapy.** Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. v.43, n.11, p.1980-1987, 2016.

HANNESTEAD, J.; DELLAGIOIA, N.; BLOCH, M. **The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis.** Neuropsychopharmacol. v. 36, p. 2452-2459, 2011.

HASHIOKA, S. et al. **Antidepressants inhibited interferon- $\gamma$ -induced microglial production of IL-6 and nitric oxide.** Exp. Neurol. v. 206, p. 33-42, 2007.

HASNAIN, M. S. et al. **QbD-Driven development and validation of a bioanalytical LC-MS method for quantification of fluoxetine in human plasma.** J. Chromatogr. Sci. p. 1-8, 2016.

HEDGES, D. W.; WOON, F. L.; HOOPES, S. P. **Caffeine-induced psychosis.** CNS Spectr. v. 14, p. 127-129, 2009.

HE, C.; CARTER, A.B. **The Metabolic Prospective and Redox Regulation of Macrophage Polarization.** J. Clin. Cell. Immunol. v.6, n.6, p.35-43, 2015.

HERR, N.; BODE, C.; DUERSCHMIED, D. **The Effects of Serotonin in Immune Cells.** Front. Cardiovasc. Med. v. 4, n.48, 2017.

HERBET, M.; GAWROŃSKA-GRZYWACZ, M.; JAGIEŁŁO-WÓJTOWICZ, E. **Evaluation of selected biochemical parameters of oxidative stress in rats pretreated with Rosuvastatin and Fluoxetine.** Acta Pol. Pharm. v. 72, n. 2, p. 261-265, 2015.

HERTZ, E. et al. **Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs.** Mol. Clin. Oncol. v. 3, p. 37-43, 2015.

HICKS, A.M. et al. **Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of**

- macrophages in SR/CR mice.** *Cancer Immun.* v.31, p. 6–11, 2006.
- HILES, S. A. et al. **Interleukin-6, C-reactive protein and interleukin-10 after antidepressant treatment in people with depression: a meta-analysis.** *Psycholog. Med.* v. 42, n. 10, p. 2015-2026, 2012.
- HILL, A. A.; REID BOLUS, W.; HASTY, A. H. **A decade of progress in adipose tissue macrophage.** *Immunol. Rev.* v. 262, p.134-152, 2014.
- HIMMERICH, H. et al. **Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro.** *J. Psychiatr. Res.* v. 47, p. 1751-1759, 2013.
- HORSSSEN, J.V. et al. **Inflammation and mitochondrial dysfunction: a vicious circle in neurodegenerative disorders?** *Neurosci. Lett.* v.17, p.30542-30546, 2017.
- HOSETH, E.Z. et al. **A Study of TNF Pathway Activation in Schizophrenia and Bipolar Disorder in Plasma and Brain Tissue.** *Schizophr. Bull.* 2017.
- HOU, L. et al. **Genetic variants associated with response to lithium treatment in bipolar disorder: a genome-wide association study.** *Lancet.* v.12, n.387, p.1085-1093, 2016.
- HUANG, Y.S. et al. **Superoxide Dismutase 2 Genetic Variation as a Susceptibility Risk Factor for Alcoholic Cirrhosis.** *Alcohol Alcohol.* v.51, n.6, p.633-637, 2016.
- ILGIN, S. et al. **Citalopram Induces Reproductive Toxicity in Male Rats.** *Birth Defects Res.* v.109, n.7, p.475-48, 2017.
- ISBIR, S. et al. **Effect of Ala16Val genetic polymorphism of MnSOD on antioxidant capacity and inflammatory response in open heart surgery.** *In vivo.* v.22, n.11, p.147-151, 2008.
- IWATA, M. et al. **The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses.** *Brain. Behav. Immun.* v.31, p.105-114, 2013.
- JEON, S. W.; KIM, Y. K. **Molecular neurobiology and promising new treatment in depression.** *Int. J. Mol. Sci.* v. 17, n. 3, p. 381-401, 2016.
- JIAMEI, L. et al. **Ameliorating antipsychotic-induced weight gain by betahistine: mechanisms and clinical implications.** *Pharmacol. Res.* v. 106, p. 51-63, 2016.
- JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, S. et al. **Stress and antioxidant parameters in patients with major depressive disorder compared to healthy controls before and after antidepressant treatment: Results from a meta-analysis.** *J. Clin. Psychiatry.* v. 76, n. 12, p. 1658-1667, 2015.
- JOPE, R. S. **Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders.** *Fron. Mol. Neurosci.* v. 9, p. 4-16, 2011.

- JUNG, I. E. C. et al. **Haloperidol and Risperidone at high concentrations activate an in vitro inflammatory response of RAW 264.7 macrophage cells by induction of apoptosis and modification of cytokine levels.** *Psychopharmacol.* v. 233, n. 9, p. 1715-1723, 2016.
- JUNQUEIRA, J. C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica.** 12. ed. Guanabara Koogan, 2013.
- KANG, Y. et al. **Alleviation of Oxidative Damage and Involvement of Nrf2-ARE Pathway in Mesodopaminergic System and Hippocampus of Status Epilepticus Rats Pretreated by Intranasal Pentoxifylline.** *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017.
- KANDIL, E.A. et al. **Imipramine and amitriptyline ameliorate the rotenone model of Parkinson's disease in rats.** *Neuroscience.* v. 22, v..332, p,26-37, 2016.
- KATO, M. et al. **Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea.** *Circulation.* v.102, n.21, p.2607-2610, 2000.
- KIM, Y. H. et al. **Lithium protects against oxidative stress-mediated cell death in  $\alpha$ -synuclein-overexpressing *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease.** *Neurosci. Res.* v. 89, p. 1666-1675, 2011.
- KIM, Y. K. et al. **Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder.** *Progr. NeuroPsychopharmacol. Biolog. Psych.* v. 31, n. 5, p. 1044-1053, 2007.
- KISS, P. J. **Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression.** *Neurochem. Int.* v. 52, p. 34-39, 2008.
- KLEINDIENST. N.; ENGEL, R.; GREIL, W. **Which clinical factors predict response to prophylactic lithium? A systematic review for bipolar disorders.** *Bipolar Dis.* v. 7, p. 404-417, 2005.
- KOBER, H. et al. **Genoprotective and hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl4-induced liver damage in rats.** *Drug. Chem. Toxicol.* v. 39, p. 48-52, 2016.
- KOOLA, M.M.; RAINES, J.K.; HAMILTON, R. G.; MCMAHON, R.P. **Can anti-inflammatory medications improve symptoms and reduce mortality in schizophrenia?** *Cur. Psychaitr .v.15, p.52-57.,* 2016.
- KREWER, C. C. et al. **Habitual intake of Guaraná and metabolic morbidities: An epidemiological study of an elderly amazonian population.** *Phytother. Res.* v. 25, p. 1367-1374, 2011.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. **The molecular neurobiology of depression.** *Nat.* v. 455, p. 894-902, 2008.
- KUBERA, M. et al. **Stimulatory effect of antidepressants on the production of IL-6.***Int.Immunopharmacol.* v.4, p.185-192, 2004.

- KUCHARZ, E. J. et al. **Mechanism of lithium-induced augmentation of T-cell proliferation.** *Int. J. Immunopharmacol.* v. 10, p. 253-259, 1988.
- LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. **Regulation of metabolism by the innate immune system.** *Nat. Rev. Endocrinol.* v. 12, n. 1, p. 15-28, 2015.
- LAGE, J. T. **Neurobiologia da Depressão.** Dissertação (Mestrado em Medicina) - Univesidade do Porto, Porto, 2010.
- LAST, C. G. et al. **When someone you love is bipolar: help and support for you and you partner.** New York, 2009.
- LEE, B. et al. **Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using chronic corticosterone injections.** *Biomol. Ther.* v. 21, n. 4, p. 313-322, 2013.
- LEE, S. H. et al. **Is increased antidepressant exposure a contributory factor to the obesity pandemic?** *Translat. Psychiatr.* v. 15, p. 1-12, 2016.
- LENG, Y. et al. **FGF-21, a novel metabolic regulator, has a robust neuroprotective role and is markedly elevated in neurons by mood stabilizers.** *Mol. Psychiatry.* v.20, n.2, p. 215-223, 2015.
- LEZA, J. C. et al. **Inflammation in schizophrenia: A question of balance.** *Neurosci. Biohehav. Rev.* v. 55, p. 612-626, 2015.
- LI, Y. et al. **Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase.** *Nat Genet.* v.11, n.4, p.376-381, 1995.
- LICHT, R.W. et al. **A lithium clinic for bipolar patients: 2-year outcome of the first 148 patients.** *Acta. Psychiatr. Scand.* v.104, n.5, p. 387–390, 2001.
- LIN, A. et al. **The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6.** *Schizophr. Res.* v. 32, p. 9-15, 1998.
- LINDQVIST, D. et al. **Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression.** *Psychoneuroendocrinol.* v.76, p.197-205, 2016.
- LIU, K. J. et al. **Modulation of the development of human monocyte-derived dendritic cells by lithium chloride.** *J. Cell. Physiol.* v. 226, p. 424-433, 2011.
- LOFTIS, J. M.; WILHELM, C. J., HUCKAN, M. **Effect of epigallocatechin gallate supplementation in schizophrenia and bipolar disorder: an 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study.** *Ther Adv. Psychopharmacol.* v.3, n.1, p. 21–27, 2013.
- LUCA, A. et al. **Gsk 3 Signalling and Redox Status in Bipolar Disorder: Evidence from Lithium Efficacy.** *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.
- LUZ, C. et al. **Impact of psychological and endocrine factors on cytokine production of**



**healthy elderly people.** Mech. Ageing Dev. v. 124, n.8–9, p. 887–895, 2003.

MCCARTHY, M.J.; LECKBAND, S.G. KELSOE, J.R. **Pharmacogenetics of lithium response in bipolar disorder.** Pharmacogenomics. v.11, n.10, p.1439-1465, 2010.

MACHADO, A. K. **Efeito cito-genômico do peróxido de hidrogênio e do guaraná (*Paullinia cupana*) em células tronco mesenquimais.** 2014. 95p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

MACHADO, A. K. et al. **Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates.** Food Res. Intern. v. 67, p. 426-433, 2015.

MACHADO, A.K., et al. **Neuroprotective Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone In Vitro Exposure.** Oxid. Med. Cell. Longev. 2016.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. **Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects.** Neurosci. Lett. v. 421, p. 33-36, 2007.

MAES, M. et al. **Increased serum interleukin-8 and interleukin-10 in schizophrenic patients resistant to treatment with neuroleptics and the stimulatory effects of clozapine on serum leukemia inhibitory factor receptor.** Schizophr. Res. v. 54, p. 281-291, 2002.

MARQUES-DEAK, A. H. et al. **Cytokine profiles in women with different subtypes of major depressive disorder.** J. Psychiatric Res. v. 41, p. 152-159, 2007.

MARTIN, M. et al. **Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3.** Nat. Immunol. v. 6, n. 8, p. 777-784, 2005.

MELO, L.G.P. et al. **Shared metabolic and immune-inflammatory, oxidative and nitrosative stress pathways in the metabolic syndrome and mood disorders.** Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. v.78, p.34-50, 2017.

MEHTA, M.M. et al. **Mitochondrial control of immunity: beyond ATP.** Nat. Rev. Immunol. 2017.

MENKES, D. B. **Transient psychotic relapse temporally related to ingestion of an ‘energy drink’.** Med. J. Aust. v. 21, n. 194, p. 206-212, 2011.

MERIKANGAS, K. R. et al. **Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative.** Arch. Gen. Psychiatry. v. 68, n. 3, p. 241-251, 2011.

MESTER, R. et al. **Caffeine withdrawal increases lithium blood levels.** Biol. Psychiatry v. 37, n.5, p.348-350, 1995.

MEYER, J. M. et al. **Inflammatory markers in schizophrenia: comparing antipsychotic effects in phase 1 of the clinical antipsychotic trials of intervention effectiveness study.** *Biolog. Psychiatry.* v. 66, n. 11, p. 1013-1022, 2009.

MIKHAK, B. et al. **Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk.** *Carcinogenesis.* v.29, n.12, p.2335-2340, 2008.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. **The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target.** *Nat. Rev. Immun.* v. 16, 2016.

MIRANDA, G.M.D. et al. **Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences.** *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.* 2016, v.19, n.3, p.507-519, 2016.

MIZUI, T. et al. **Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: Multi-ligand model of growth factor signaling.** *Pharmacol. Res.* v. 105, p. 93-98, 2016.

MOFFAT, A. **Clarke's isolation and identification of drugs.** 2. ed. Pharmaceutical Press, 1986.

MONTAGNER, G. F. S. **Efeito *in vitro* do polimorfismo Ala16Val do gene da superóxido dismutase dependente de manganês no metabolismo oxidativo de linfócitos.** 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

MONTAGNER, G.F.S. et al. **Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes.** *Toxicol. In Vitro.* v.24, n.5, p.1410-1416, 2010.

MONTANO, M.A et al. **Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity.** *Mol. Cell. Biochem.* v.328, n.1-2, p.33-40, 2009.

MONTANO, M.A. et al. **Inflammatory cytokines *in vitro* production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells.** *Cytokine.* v.60, n.1, p.30-33, 2012.

MONTIEL, I. J. et al. **SOD2 gene Val16Ala polymorphism is associated with macroalbuminuria in Mexican type 2 diabetes patients: a comparative study and meta-analysis.** *BMC Med. Genet.* v.11, n.14, p.110-114, 2013.

MORABITO, C. et al. **Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach.** *Free Radic. Biol. Med.* v. 48, p. 579-589, 2010.

MORABITO, F. et al. **Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma.** *Mediat. Inflamm.* v. 13, p. 381-383, 2004.

- MOREIRA, E.G. et al. **Lowered PON1 activities are strongly associated with depression and bipolar disorder, recurrence of (hypo) mania and depression, increased disability and lowered quality of life.** World J. Biol. Psychiatry.v. 30, p.1-13, 2017.
- MORRIS, G. Berk M. **The Putative Use of Lithium in Alzheimer's Disease.** Curr. Alzheimer Res. v.13, n.8, p.853-861, 2016.
- MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunol. Meth. v. 65, p. 55-63, 1983.
- MULLER, N. et al. **Cellular and humoral immune system in schizophrenia: a conceptual reevaluation.** World J. Biol. Psychiatr. v. 1, p 173-179, 2000.
- MUNEER, A. **The neurobiology of bipolar disorder: An integrated approach.** Chonnam. Med. J. v. 52, n. 1, p. 18-37, 2016.
- MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. (eds.) **The Global Burden of Disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020.** Cambridge, MA: Harvard School of Public Health on behalf of the World Health Organization and the World Bank, 1996.
- MURRAY, E. A.; WISE, S. P.; DREVETS, W. C. **Localization of dysfunction in major depressive disorder: Prefrontal cortex and amygdala.** Biol. Psychiatry. v. 69, p. 43-54, 2011.
- NAHMAN, S.; BELMAKER, R. H.; AZAB, A. N. **Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells.** Innate Immun. v. 18, p. 447-458, 2012.
- NASSAR, A.; AZAB, A. N. **Effects of lithium on inflammation.** ACS Chem. Neurosci. v. 5, p. 451-458, 2014.
- National Institute of Mental Health.** Disponível em:  
<<https://www.nimh.nih.gov/index.shtml>>. Acesso em: 02 jun. 2016.
- NEMEROFF, C. B. **The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives.** J. Psychiatry Res. v. 41, p. 189-206, 2007.
- NUMAKAWA, T.; et al. **BDNF function and intracellular signaling in neurons.** Histol. Histopathol. v. 25, p. 237-258, 2010.
- OBUCHOWICZ, E. et al. **Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell culture.** Int. J. Neuropsychopharmacol. v. 9, p. 27-35, 2006.
- OMATA, N. et al. **Lentivirally mediated GSK-3 $\beta$  silencing in the hippocampal dentate gyrus induces antidepressant-like effects in stressed mice.** Int. J. Neuropsychopharmacol. v. 14, p. 711-717, 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **World population aging**. Disponível em :<[http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015\\_Report.pdf](http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf)>. Acesso em 05 de junho de 2016.

OS, J. V.; KENIS, G.; RUTTEN, B. P. F. **The environment and schizophrenia**. *Nat.* v. 468, p. 203-212, 2010.

OTOBONE, F. J. et al. **Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [Paullinia cupana var. sorbilis (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats**. *Phytother. Res.* v. 21, p. 531-535, 2007.

OWEN, M. J.; SAWA, A.; MORTENSEN, P. B. **Schizophrenia**. *Lancet.* v. 388, p. 86-97, 2016.

PALUDO, F.J. et al. **Effects of 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene in the production of intracellular reactive species in peripheral blood mononuclear cells with and without lipopolysaccharides induction**. *Free Radic. Res.* v.48, n.2, p.190–199, 2014.

PARK, H. J. et al. **Selective GSK-3beta inhibitors attenuate the cisplatin-induced cytotoxicity of auditory cells**. *Hear. Res.* v. 257, p. 53-62, 2009.

PARK, S. et al. **Effects of ziprasidone and olanzapine on body composition and metabolic parameters: an open-label comparative pilot study**. *Behav. Brain. Funct.* v. 9, p. 27-32, 2013.

PASCO, J.A. et al. **Association of high-sensitivity C-reactive protein with de novo major depression**. *Br. J. Psychiatry.* v.197, n.5, p.372-377, 2010.

PASTOOR, D.; GOBBURU, J. **Clinical pharmacology review of escitalopram for the treatment of depression**. *Expert Opin. Drug Metabol.Toxicol.* v. 10, n. 1, p. 121-128, 2014.

PASQUALI, M. A. et al. **A longitudinal study of neurotrophic, oxidative, and inflammatory markers in first-onset depression in midlife women**. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2017.

PATTEN, S. et al. **Major depression, antidepressant medication and the risk of obesity**. *Psychother. Psychosom.* v. 78, p. 182-189, 2009.

PERL, A. **Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus**. *Nat. Rev. Rheumatol.* v. 9, p. 674-686, 2013.

PETTY, F. **GABA and mood disorders: a brief review and hypothesis**. *J. Affect. Disord.* v. 34, n. 4, p. 275-281, 1995.

PINKE, K.H. et al. **Proinflammatory profile of in vitro monocytes in the ageing is affected by lymphocytes presence**. *Immun. Ageing.* v.10, n.1, p.22–26, 2013.

POCIOT, F. et al. **A manganese superoxide dismutase (SOD2) gene polymorphism in insulin-dependent diabetes mellitus**. *Dis. Markers.*v.11, n.5-6, p.267-274, 1993.

PORTELLA, R. L. et al. **Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) effects on LDL oxidation in elderly people: an *in vitro* and *in vivo* study.** Lipids Health Dis. v. 12, p. 1-12, 2013.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. **Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders.** Trends Cognit. Sci. v. 16, p. 61-71, 2012.

PRINCE, M. et al. **No health without mental health.** Lancet. v. 370, p. 859-877, 2007.

PROSSER, J.M.; FIEVE, R.R. **Patients receiving lithium therapy have a reduced prevalence of neurological and cardiovascular disorders.** Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. v.71, p.39-44, 2016.

RAISON, C. L. et al. **A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers.** JAMA Psychiatry. v. 70, p. 31-41, 2013.

RAJENDRAPRASAD, N.; BASAVIAIAH, K. **Highly sensitive spectrophotometric determination of olanzapine using cerium (IV) and iron (II) complexes of 1,10 phenanthroline and 2,2'- bipyridyl.** J. Analt. Chem. v. 65, n. 5, p. 482-488, 2010.

RAMIREZ, K. et al. **Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance.** Brain Beh.Immun. v. 46, p. 212-220, 2015.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale - Farmacologia.** 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 808p.

RAO, N. **The clinical pharmacokinetics of escitalopram.** Clin. Pharmacokinet. v. 46, n. 4, p. 281-290, 2007.

REGE, S.; HODGKINSON, S. J. **Immune dysregulation and autoimmunity in bipolar disorder: Synthesis of the evidence and its clinical application.** Aust. N. Z. J. Psychiatry. v. 47, p. 1136-1151, 2013.

ROBSON, P. J.; GUY, G. W.; DI MARZO, V. **Cannabinoids and schizophrenia: therapeutic prospects.** Curr. Pharm. Des. v. 20, n. 13, p. 2194-2204, 2014.

ROITT, I. M.; DELVES, P.J.; BURTON, D.R.; MARTIN, S. J. **Fundamentos de Imunologia.** 12. ed. Guanabara Koogan, 2014.

ROSA, A. O. et al. **Antidepressantlike effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice.** Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. v. 32, p. 1549-1556, 2008.

ROSENBLAT, J. D. et al. **Inflamed moods: a review of the interactions between inflammation and mood disorders.** Progr. NeuroPsychopharmacol. Biolog. Psychiat. v. 53, p. 23-34, 2014.

ROTHERMUNDT, M.; AROLT, V.; BAYER, T. **Review of immunological and immunopathological findings in schizophrenia.** Brain, Behav. Immunol. v. 15, p. 319-339, 2001.

RYBAKOWSKI, J.K. **Effect of Lithium on Neurocognitive Functioning.** Curr. Alzheimer Res. v.13, n.8, p.887-893, 2016.

RYUNG, W. H.; YOUNG, S. W.; WON-MYONG, B. **Caffeine-induced psychiatric manifestations: a review.** Clin. Psychopharmacol. v. 30, p. 179-182, 2015.

RZEZNICZEK, S. et al. **Decreased sensitivity to paroxetine-induced inhibition of peripheral blood mononuclear cell growth in depressed and antidepressant treatment-resistant patients.** Transl. Psychiatry. v. 6, p. 1-7, 2016.

SAAD, A. B. et al. **Lithium induced, oxidative stress and related damages in testes and heart in male rats: The protective effects of Malva sylvestris extract.** Biomed. Pharmacother. v.86, p.127-135, 2017.

SÁRVÁRI, A. K. et al. **Atypical antipsychotics induce both proinflammatory and adipogenic gene expression in human adipocytes in vitro.** Bioch. Bioph. Res. Communic. v. 450, n. 4, p. 1383-1389, 2014.

SCOLA, G. et al. **A Fresh Look At Complex I In Microarray Data: Clues To Understanding Disease-Specific Mitochondrial Alterations In Bipolar Disorder.** Biol. Psychiatry. v.73, p.4-5, 2013.

SCHNEIDER, E. et al. **Epigenetic Dysregulation in the Pre-frontal Cortex of Suicide Completers.** Cytogenet. Genome Res. v.146, p. 19–27, 2015.

SCHMIDT, H.D.; DUMAN, R.S. **Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models.** Neuropsychopharmacol. v. 35, n.12, p. 2378–2391, 2010.

SCHMIDT, C.; LEIBIGER, J.; FENDT, M. **The norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine is more potent in treating murine narcoleptic episodes than the serotonin reuptake inhibitor escitalopram.** Behav Brain Res. v.308, p.205-210, 2016.

SERRETTI, A.; MANDELLI, L. **Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis.** J. Clin. Psychiatry. v. 71, p. 1259-1272, 2010.

SHAY, J. **Molecular Mechanisms and Therapeutic Effects of (-)-Epicatechin and Other Polyphenols in Cancer, Inflammation, Diabetes, and Neurodegeneration.** Oxid. Med. Cell. Longev. 2015.

SILVA, P. **Farmacologia.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1352 p.

SOUZA, M. B. R. **Análise genética de novos potenciais polimorfismos de risco em transtornos do humor e utilização de abordagens computacionais em busca de genes**

**candidatos a Doença de Alzheimer.** 2013. 97f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2013.

SULEIMAN, L. et al. **Guaraná Supplementation Modulates Tryglicerides and Some Metabolic Blood Biomarkers in Overweight Subjects.** *Ann. Obes. Disord.* v.1, 2016.

SUSSMAN N, GINSBERG DL, BIKOFF J. **Effects of nefazodone on body weight: a pooled analysis of selective serotonin reuptake inhibitor-and imipramine-controlled trials.** *J. Clin. Psychiatry.* v. 62, p.256-262, 2001.

SUTTON, A. et al. **The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria.** *Pharmacogenet.* v.13, n.3, p.145-157, 2003.

SVENNINGSSON, P.; NOMIKOS, G.G.; FREDHOLM, B. B. **The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions.** *J. Neurosci.* v.19, p.4011–4022, 1999.

TALLON, D. et al. **Mirtazapine added to selective serotonin reuptake inhibitors for treatment-resistant depression in primary care (MIR trial): study protocol for a randomised controlled trial.** *Trials.* v.17, p 17- 26, 2016.

TAN, H.Y. et al. **The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases.** *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016.

TAN, W. F. et al. **Protective effects of lithium treatment for spatial memory deficits induced by tau hyperphosphorylation in splenectomized rats.** *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* v. 37, p.1010–1015, 2010.

TIAN, C. **Association of C47T polymorphism in SOD2 gene with coronary artery disease: a case-control study and a meta-analysis.** *Mol. Biol. Rep.* v.39, n.5, p.5269-5276, 2012.

TIBREWAL, P.; DHILLON, R. **Caffeine induced psychotic exacerbation.** *Aust. N. Z. J. Psychiatry.* v.45, p.179–180, 2011.

TSANKOVA, N.M. et al. **Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action.** *Nat. Neurosci.* v.9, n.4, p.519–525, 2006.

TSANKOVA, N. et al. **Epigenetic regulation in psychiatric disorders.** *Nat. Rev. Neurosc.* v.8, p.355-367, 2007.

TSAI S.Y. et al. **Soluble interleukin-6 receptor level reflecting the illness activity in bipolar disorder.** *Aust. N. Z. J. Psychiatry.* v.48, p.382–383, 2014.

TYRING, S. et al. **Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial.** *Lancet.* v.367, p.29–35, 2006.

- UGUZ, F. et al. **Weight Gain And Associated Factors In Patients Using Newer Antidepressant Drugs**. *Gen. Hosp. Psychiatry*. v.37, p.46-48, 2015.
- UWAI, Y. et al. **Enantioselective Effect of Flurbiprofen on Lithium Disposition in Rats**. *Pharmacol.* v.99, n.5-6, p.236-239, 2017.
- VALASQUES JUNIOR, G.L. **Farmacologia Clinica do Sistema Nervoso Central**. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2015. Disponível em: <<http://www.uesb.br/eventos/farmacologiaclinicascnc/materiais/farmacos-antidepressivos.pdf>> Acesso: em 06 mai 2016.
- VASCONCELOS, S.M. L. et al. **Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação**. *Quím. Nova*, v.30, p.1323-1338, 2007.
- VAN DEN AMEELE, S. et al. **The effect of mood-stabilizing drugs on cytokine levels in bipolar disorder: A systematic review**. *J. Affect. Disord.* v. 203, p.364-373, 2016.
- VAN DEN BOGAARD, B. et al. **Effects on Peripheral and Central Blood Pressure of Cocoa With Natural or High-Dose Theobromine A Randomized, Double-Blind Crossover Trial**. *Hypertens.* v.56, p.839–846, 2010.
- VENTRIGLIO, A. et al. **Metabolic issues in patients affected by schizophrenia: clinical characteristics and medical management**. *Front.Neurosc.* v.9, p.1-7, 2015.
- VITALE, G.; SALVIOLI, S.; FRANCESCHI, C. **Oxidative stress and the ageing endocrine system**. *Nat. Rev. Endocrinol.* v.9, p. 228–240, 2013.
- VORONOV, E.; CARMI, Y.; APTE, R. N. **The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis**. *Front. Physiol.* v. 5, p. 114-121, 2014.
- WANG, G.C.; CASOLARO, V. **Immunologic changes in frail older adults**. *Transl. Med. UniSa.* v. 24, n.9, p.1–6, 2014.
- WANG, H.R.; WOO, Y.S.; BAHK, W.M. **Caffeine-induced psychiatric manifestations: a review**. *Int. Clin. Psychopharmacol.* v.30, n.4, p.179-182, 2015.
- WANG, S.S. et al. **Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma**. *Carcinog.* v.27, n.9, p.1828-1834, 2006.
- WARSH, J.J.; YOUNG, L.T.; LI, P.P. **Bipolar medications: mechanisms of action**. 1. ed. Washington (DC): American Psychiatric Press, pp. 299–329, 2000.
- WHO, **Depression Let's talk. World Health Day 2017**, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2017/toolkit.pdf>>. Acesso em 05 de junho de 2017.
- WILLIAMS, L.M. **Precision psychiatry: a neural circuit taxonomy for depression and anxiety**. *Lancet Psychiatry.* v. 3, n. 5, p. 472-480, 2016.



WONG, M.; LICINIO, J. **Research and treatment approaches to depression.** Nat. Rev. Neurosci. v. 2, p. 343-351, 2001.

WOODGETT, J.R.; OHASHI, P.S. **GSK3: an in-Toll-erant protein kinase?** Nat. Immunol. v. 6, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Mental disorders.** Genebra, 2016.  
Disponível em: <<http://www.portal.pmnch.org/mediacentre/factsheets/fs396/en/>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

WRIGHT C.E. et al. **Acute inflammation and negative mood: Mediation by cytokine activation.** Brain, Behav. Immun. v.19, p.345-350, 2005.

XU, M. et al. **Role for Functional SOD2 Polymorphism in Pulmonary Arterial Hypertension in a Chinese Population.** Int. J. Environ Res. Public. Health. v.6, n.14, 2017.

XU, Z. et al. **SOD2 rs4880 CT/CC genotype predicts poor survival for Chinese gastric cancer patients received platinum and fluorouracil based adjuvant chemotherapy.** Am. J. Transl. Res. v.7, n.2, p.401-410, 2015.

YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. **Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*.** Molec. v.12, p.1950-1963, 2007.

YOON, Y. et al. **Weight Gain Effects of Second-Generation Antipsychotic Treatment in Autism Spectrum Disorder.** J.Child. Adolesc. Psychopharmacol. 2016.

YOUNG, J. et al. **Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control subjects.** Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids. v.76, p.73-85, 2007.

YOUNG, L.T. et al. **Reduced brain 5-HT and elevated NE turnover and metabolites in bipolar affective disorder.** Biol. Psychiatry. v.35, 121-127, 1994.

YU, J. J. et al. **Chronic Supplementation of Curcumin Enhances the Efficacy of Antidepressants in Major Depressive Disorder: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study.** J. Clin. Psychopharmacol. v.35, n.4, p.406-410, 2015.

ZEJNILOVIC, J. et al. **Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer.** Cancer Genet. Cytogenet. v.189, n.1, p.1-4, 2009.

ZELKO, I. N. et.al. **Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression.** Free Radic. Biol. Med. v.33, n.3, p.337-449, 2002.

ZHANG, Q. et al. **Effects of olanzapine on the elevation of macrophage infiltration and pro-inflammatory cytokine expression in female rats.** J. Psychopharmacol. v. 28, n. 12, p. 1161-1169, 2014.

ZHANG, X.Y. et al. **Cognitive function, plasma MnSOD activity, and MnSOD Ala-9Val polymorphism in patients with schizophrenia and normal controls.** Schizophr. Bull. v.40, n.3, p.592-601, 2014.

ZHANG, Y. et al. **NLRP3 inflammasome mediates chronic mild stress-induced depression in mice via neuroinflammation.** Int. J. Neuropsychopharmacol. v.18, 2015.

ZHU, C. B. et al. **Interleukin-1 receptor activation by systemic lipopolysaccharide induces behavioral despair linked to MAPK regulation of CNS serotonin transporters.** Neuropsychopharmacol. v.35, p. 2510–2520, 2010.

ZHU, Z. F. et al. **Neuroprotective effect and cognitive outcome of chronic lithium on traumatic brain injury in mice.** Brain. Res. Bull. v.83, p 272–277, 2010.

ZOMKOWSKI, A. D. E. **Estudo do Mecanismo de Ação e do Efeito Neuroprotetor de Compostos Antidepressivos (Duloxetina, Escitalopram).** 2012. 162p. Tese (Doutorado em Bioquímica) -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2012.

## ANEXO A- COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO ARTIGO 1

Page 1 of 34

Rejuvenation Research  
 © Mary Ann Liebert, Inc.  
 DOI: 10.1089/rej.2016.1892  
 1

*Rejuvenation Research*

## The *in vitro* influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence

Abbreviated title: Immunosenescence and oxidative imbalance

Fernanda Barbisan<sup>1,2</sup>, Verônica Farina Azzolin<sup>1</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>2</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>3</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

<sup>2</sup> Open University of the Third Age, State University of Amazonas, Manaus-AM, Brazil

<sup>3</sup> Center of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Canoas-RS, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

\*Corresponding author

Address for correspondence and reprints: Ivana Beatrice Mânica da Cruz, MSc, PhD, Laboratory of Biogenomics, Center of Health Sciences, Avenue Roraima 1000, Building 19, Chamber 3102, Santa Maria, RS, Brazil, Zip Code 97105-900. Phone: 55-55-91199099; Fax: 55-55-32208239; Email: [ivana.ufsm@gmail.com](mailto:ivana.ufsm@gmail.com)


**Word count:** 5,421

**Keywords:** SOD2, MnSOD, gene polymorphism, oxidative stress, inflammation

Rejuvenation Research  
 The *in vitro* influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence (doi: 10.1089/rej.2016.1892)  
 This article has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copy editing and proof correction. The final published version may differ from this proof.  
 The *in vitro* influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence (doi: 10.1089/rej.2016.1892)  
 This paper has been peer-reviewed and accepted for publication, but has yet to undergo copy editing and proof correction. The final published version may differ from this proof.

**ANEXO B- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 3**

4151594: Acknowledging Receipt Entrada x 🖨️ 📧

 **BioMed Research International** mohamed.nabil@hindawi.com [por\\_amazonases.com](mailto:por_amazonases.com) 15:11 (Há 1 minuto) ☆ ↩️ ▾

para mim, fernandabarbis., azzolinveronica, cibeleteixeira, mhmastella, unatieuler, paspl, cahossaine, duartmm ▾

Dear Dr. Cruz,

The Research Article titled "A xanthine-catechin mix intensifies the in vitro lithium anti-inflammatory response in activated-macrophages," by Fernanda Barbisan, Verônica Azzolin, Cibele Teixeira, Moisés Mastella, Euler Esteves Ribeiro, Pedro do Prado-Lima, Raquel Praia, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte and Ivana Cruz has been received and assigned the number 4151594.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to BioMed Research International.

Best regards,

--  
\*\*\*\*\*  
Mohamed Nabil  
Editorial Office  
Hindawi  
<http://www.hindawi.com>  
\*\*\*\*\*

## ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 4

**PLOS ONE** A Peer-Reviewed, Open Access Journal

Editorial Manager®

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: ibmcruz

---

**Submissions Being Processed for Author Ivana Beatrice Mânica da Cruz, MSc, PhD**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">View QC Results</a> <a href="#">Send E-mail</a>	PONE-D-17-26879	Lithium anti-inflammatory effects is differentially modulated by interaction with antidepressant drugs determined by an inflammatory ratio analysis	Jul 18 2017 4:59AM	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

## ANEXO D- ARTIGO PUBLICADO COMO 1º AUTOR DURANTE O PERÍODO DE DOUTORADO, NÃO RELACIONADO A TESE

Biogerontology  
DOI 10.1007/s10522-015-9561-4

### RESEARCH ARTICLE

## The anti-inflammatory effects of resveratrol on human peripheral blood mononuclear cells are influenced by a superoxide dismutase 2 gene polymorphism

Dianni Capeleto · Fernanda Barbisan · Veronica Azzolin · Eduardo Bortoluzzi Dornelles · Felipe Rogalski · Cibele Ferreira Teixeira · Alencar Kolinski Machado · Francine Carla Cadona · Talis da Silva · Thiago Duarte · Marta Maria Medeiros Frescura Duarte · Ivana Beatrice Mañica da Cruz

Received: 28 December 2014 / Accepted: 17 February 2015  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

**Abstract** Resveratrol is an molecule that provides both anti-inflammatory and antioxidant properties. However, it is unclear whether the basal oxidative state of the cell has any influence on the effects of this compound. In humans, a single nucleotide polymorphism (SNP) is present in the enzyme manganese superoxide dismutase (SOD2), localized in codon 16 (rs4880), which can either be an alanine (A) or valine (V). This SNP causes an imbalance in the cellular levels of SOD2, where AA- and VV-genotypes result in higher or lower enzymatic activity, respectively. Furthermore, the VV-genotype has been associated with high levels of inflammatory cytokines. Here, we examined the effects of a range of resveratrol

concentrations on the in vitro activation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) carrying different Ala16Val-SOD2 genotypes. Cell proliferation, several oxidative biomarkers and cytokines (IL-1b, IL-6, TNF $\alpha$ , IgC and IL-10) were analyzed. In addition, the effects of resveratrol on the expression of the *sirt1* gene were evaluated by qRT-PCR. After 24 h exposure to resveratrol, A-genotype PBMCs displayed a decrease in cell proliferation, whilst VV-cells contrasted; At 10  $\mu$ M resveratrol, there was a significant decrease in the production of inflammatory cytokines in A-allele cells; however, VV-cells generally displayed a subtle decrease in these, except for TNF $\alpha$ , which was not affected. In all SOD2 genotypes cells exposed to resveratrol resulted in an upregulation of Sirt1 levels. Together, these results suggest that the effect of resveratrol on human PBMC activation is not universal and is dependent on the Ala16Val-SOD2 SNP.

Dianni Capeleto and Fernanda Barbisan have contributed equally to produce the present study.

D. Capeleto · F. Barbisan · V. Azzolin · F. C. Cadona · T. Duarte · I. B. M. da Cruz (&) · Pharmacology Graduate Program, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria, RS 90105900, Brazil  
e-mail: [ibmcruz@hotmail.com](mailto:ibmcruz@hotmail.com)

E. B. Dornelles · A. K. Machado · T. da Silva · I. B. M. da Cruz · Biochemical Toxicology Graduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

F. Rogalski · C. F. Teixeira · M. M. M. F. Duarte · I. B. M. da Cruz · Biogenomic Laboratory, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

**Keywords** Superoxide dismutase manganese-dependent · Sirtuin 1 · Cytokines · Oxidative stress · Resveratrol · Inflammation

### Introduction

Resveratrol (3,5,4<sup>0</sup>-trihydroxy-*trans*-stilbene); a polyphenol compound found at high concentrations in grapes that displays anticarcinogenic, cardioprotective