

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

Ivo Emílio da Cruz Jung

**INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO NA RESILIÊNCIA PSICO-COMPORTAMENTAL: UM
ESTUDO TRANSLACIONAL**

Santa Maria, RS
2021

Ivo Emílio da Cruz Jung

**INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO NA RESILIÊNCIA PSICO-COMPORTAMENTAL: UM ESTUDO
TRANSLACIONAL**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**

Orientadora: Dra. Marta Maria Medeiros Duarte
Coorientadora: Dra. Fernanda Barbisan

Santa Maria, RS

2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Jung, Ivo Emilio da Cruz
INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO NA RESILIÊNCIA PSICO-COMPORTAMENTAL: UM
ESTUDO TRANSLACIONAL / Ivo Emilio da Cruz Jung.- 2021.
182 p.; 30 cm

Orientadora: Marta Maria Medeiros Frescura Duarte
Coorientadora: Fernanda Barbisan
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. Polimorfismo Vall6Ala-SOD2 2. Depressão 3.
Transtornos Psiquiátricos 4. Inflamação 5. Eisenia
Fetida I. Duarte, Marta Maria Medeiros Frescura II.
Barbisan, Fernanda III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, IVO EMILIO DA CRUZ JUNG, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Ivo Emílio da Cruz Jung

**INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO NA RESILIÊNCIA PSICO-COMPORTAMENTAL: UM ESTUDO
TRANSLACIONAL**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Aprovado em 18 de junho de 2021.

Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)

Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)

Marco Aurélio Echart Montano, Dr. (UNOESC)

Jacqueline Da Costa Escobar Piccoli, Dr^a. (UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me auxiliaram na realização do meu doutorado, em especial

- a minha orientadora, Prof .Dra. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte por todo apoio e disposição em meu auxiliar e me apoiar ao longo do curso de doutorado e realização da dissertação;

- a minha co-orientadora Prof. Dra. Fernanda Barbisan por todo auxilio e paciência;

- a Profa. Dra Ivana Beatrice Mânica da Cruz, coordenadora do Laboratório de Biogenômica (UFSM), por todo apoio;

- a todos os colegas e amigos do Laboratório de Biogenômica (UFSM), pelo apoio durante o curso e além quando necessário;

- ao Laboratório BioRep da UFSM por terem disponibilizado o uso de equipamentos para análises realizadas;

- aos meus pais (biológicos e emprestados: Ivana e Eduardo, Nestor e Tânia), avós (Albano, Ana, Ivo e Beatriz), aos meus tios, primos e meus irmãos: Ronald, Pedro, Henrique e Felipe;

- a minha companheira Louara, que me atura e me apoia, em especial durante esta fase difícil de pandemia. Também ao nosso filhote canino (Zoggy);

- a todos os meus amigos, especialmente a “gurizada do RPG”, que sempre ajudaram a preservar minha sanidade durante tempos de estresse;

-aos amigos Pesquisadores da Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade de Manaus-AM;

- ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização das pesquisas laboratoriais;

- aos professores e funcionários do Programa de Pós- Graduação Farmacologia pelo apoio e aprendizagem.

RESUMO

INFLUÊNCIA DO DESBALANÇO SUPERÓXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA RESILIÊNCIA PSICO-COMPORTAMENTAL: UM ESTUDO TRANSLACIONAL

AUTOR: Ivo Emilio da Cruz Jung

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Fernanda Barbisan

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 18 de junho de 2021.

Introdução: O estresse psicossocial é considerado um gatilho no desenvolvimento de diversas doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs), em especial transtornos psiquiátricos como a depressão maior. Entretanto, eventos estressantes são percebidos de modo diferenciado entre as pessoas. Esta capacidade de recuperação é denominada resiliência e parece ser geneticamente influenciada, inclusive pelo polimorfismo Val16Ala da enzima antioxidante SOD2, que pode gerar 3 diferentes genótipos AA, VV, AV, que influenciam o balanço Superóxido-Peróxido de Hidrogênio (S-HP), no organismo. **Objetivos:** Avaliar, através de um estudo translacional, a influência genética e farmacológica do desbalanço S-HP. **Métodos:** o primeiro estudo foi do tipo caso-controle no qual foi avaliado a associação entre o polimorfismo Val16Ala-SOD2 com menor resiliência (identificada pela autopercepção de exposição ao estresse) e risco de depressão em idosos. O segundo estudo buscou averiguar se os diferentes genótipos do polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderiam influenciar os níveis basais de moléculas do eixo Hipotálamo-Pituitária Adrenal associados a resposta ao estresse (cortisol, ACTH, DHEA) e também do fator neurotrófico BDNF em 90 adultos jovens sem histórico prévio de transtornos psiquiátricos. O terceiro estudo foi conduzido em minhocas californianas vermelhas (*Eisenia fetida*). **Resultado:** O primeiro estudo mostrou que portadores do genótipo VV-SOD2 independente do status de depressão também se perceberam mais estressados do que os demais. Ainda, idosos portadores deste genótipo apresentaram maior frequência de polifarmácia e ingestão diária de fármacos. O conjunto dos resultados corroborou a hipótese de que o desbalanço S-HP associado a inflamação crônica pode aumentar o risco de autopercepção do estresse, que indica menor resiliência e o risco de depressão em idosos. No segundo estudo foi observado que portadores do genótipo VV-SOD2 apresentavam níveis matinais de cortisol e ACTH mais elevados e menores níveis de DHEA e BDNF do que adultos portadores do alelo-A (AA e AV-SOD2). Estes resultados sugeriram que o desbalanço S-HP associado ao polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderia modular marcadores do eixo HPA e da neurogênese independente do indivíduo estar estressado ou deprimido. Por fim, a investigação conduzida no modelo experimental *E.fetida* apresentou resultados relevantes em relação ao papel do desbalanço S-HP no metabolismo oxidativo-inflamatório e no comportamento de sobrevivência. O desbalanço S-HP, tanto induzido pela rotenona (VV-like) quanto pela porfirina (AA-like) causou alterações importantes no metabolismo oxidativo, inflamatório e no comportamento de sobrevivência das minhocas. Em síntese, enquanto minhocas AA-like apresentaram uma melhora potencial na sua imunocompetência e em situações de risco de vida, as minhocas VV-like apresentaram um perfil similar a inflamação crônica e menor capacidade de proteção comportamental frente a exposição ao estresse ambiental. Estes resultados sugeriram que o desbalanço S-HP poderia modular o sistema imune e a resposta comportamental ao estresse via alterações no metabolismo imune. **Conclusão:** Apesar das limitações metodológicas de cada estudo, o conjunto dos resultados sugere que alterações inflamatórias produzidas pelo desbalanço S-HP poderiam induzir estados diminuídos de resiliência psico-comportamental tanto em seres humanos quanto em modelos experimentais primitivos, como é o caso das minhocas. Estes resultados são relevantes na medida em que poderão ser utilizados como subsídio para investigações que levem ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas principalmente associadas a psicoterapia cognitivo-comportamental que atenuem a sensibilidade de portadores do genótipo VV a estressores psicossocial e também auxiliem a atenuar os sintomas debilitantes de pacientes com diagnóstico de depressão.

Palavras-Chave: Polimorfismo Val16Ala-SOD2. Depressão. Transtornos Psiquiátricos. Inflamação. Estresse oxidativo, *Eisenia Fetida*

ABSTRACT

INFLUENCE OF THE SUPEROXIDE-PEROXIDE UNBALANCE OF HYDROGEN IN PSYCHO-BEHAVIORAL RESILIENCE: A TRANSLATIO STUDY

AUTHOR: Ivo Emilio da Cruz Jung

ADVISOR: Prof^ª Dr^ª Marta Maria Frescura Medeiros Duarte

CO-ADVISOR: Prof^ª Dr^ª Fernanda Barbisan

Introduction: The psychosocial stress is considered a trigger in the development of several non-communicable chronic diseases (NCDs), especially psychiatric disorders such as Depression. However, stressful events are perceived differently among people. This ability to recover is called resilience and appears to be genetically influenced, including the Val16Ala polymorphism, of the antioxidant enzyme SOD-2 which can generate 3 different genotypes AA, VV, AV, which influence the Superoxide-Hydrogen Peroxide (S-HP) balance in the body. **Objectives:** To evaluate, through a translational study, the genetic and pharmacological influence of the S-HP imbalance. **Methods:** The first study was a case-control study in which the association between the Val16Ala-SOD2 polymorphism with lower resilience (identified by self-perceived exposure to stress) and risk of depression in the evaluated elderly. The second study sought to investigate whether the different genotypes of the Val16Ala-SOD2 polymorphism could influence the basal levels of molecules of the Hypothalamus-Pituitary Adrenal axis associated with stress response (cortisol, ACTH, DHEA) and of the neurotrophic factor BDNF in 90 young adults without previous history of psychiatric disorders. The third study was conducted in Californian red earthworms (*Eisenia Fetida*). **Results:** The first study showed that carriers of the VV-SOD2 genotype, regardless of the status of depression, also perceived themselves as more stressed than the others. In addition, elderly people with this genotype had a higher frequency of polypharmacy and daily drug intake. The set of results supported the hypothesis that S-HP imbalance associated with chronic inflammation may increase the risk of self-perceived stress, which indicates lower resilience and the risk of depression in elderly people. In the second study, we observed that carriers of the VV-SOD2 genotype had higher morning cortisol and ACTH levels and lower levels of DHEA and BDNF than adults carrying the A-allele (AA and AV-SOD2). These results suggested that the S-HP imbalance associated with the Val16Ala-SOD2 polymorphism could modulate markers of the HPA axis and neurogenesis regardless of the individual being stressed or depressed. Finally, the investigation carried out in the experimental model *E. Fetida* showed relevant results regarding the role of the S-HP unbalance in the oxidative-inflammatory metabolism and in the survival behavior. The S-HP unbalance, both induced by rotenone (VV-like) and porphyrin (AA-like) caused important alterations in the oxidative and inflammatory metabolism and in the survival behavior of earthworms. In summary, while AA-like earthworms showed a potential improvement in their immunocompetence and in life-threatening situations, VV-like earthworms presented a profile similar to chronic inflammation and a lower capacity for behavioral protection against exposure to environmental stress. These results suggested that the S-HP imbalance could modulate the immune system and the behavioral response to stress via alterations in immune metabolism. **Conclusion:** Despite the methodological limitations of each study, the set of results suggests that inflammatory changes produced by S-HP unbalance could induce reduced states of psycho-behavioral resilience both in human beings and in primitive experimental models, as is the case with earthworms. These results are relevant as they can be used as support for investigations that lead to the development of therapeutic strategies mainly associated with cognitive-behavioral psychotherapy that attenuate the sensitivity of patients with the VV genotype to psychosocial stressors and help to alleviate the debilitating symptoms of patients diagnosed with depression.

Keywords: Val16Ala-SOD2 polymorphism. Depression. Psychiatric Disorders. Inflammation. Oxidative stress, *Eisenia Fetida*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fases da Síndrome Geral de Adaptação.....	26
Figura 2- Percepção do estresse é influenciada pelas experiências, pela genética e pelo comportamento do indivíduo.....	27
Figura 3- Esquema geral de modulação dos níveis de cortisol frente a um agente estressor.....	30
Figura 4- Esquema geral da síntese do hormônio esteroide cortisol pela glândula da adrenal.....	31
Figura 5- Mecanismo da síntese da produção de cortisol pelas células do córtex da glândula suprarrenal.....	32
Figura 6 - Esquema da modulação circadiana dos níveis de cortisol e do ACTH modulados pelo eixo HPA.....	33
Figura 7 – Principais alterações metabólicas desencadeadas pela liberação do cortisol em resposta a um agente estressor.....	34
Figura 8 - Principais estruturas e circuitos do sistema nervoso central associados a resposta ao estresse físico e psicológico.....	36
Figura 9- Encurtamento telomérico.....	40
Figura 10- Relação eixo HPA cortisol e células imunes.....	44
Figura 11- Síntese dos principais eventos celulares, fisiológicos e patológicos associados a exposição ao estresse crônico de origem psicossocial.....	45
Figura 12- Da codificação da proteína SOD2 a ativação da enzima SOD2.....	48
Figura 13- Polimorfismo Val16Ala-SOD2.....	49
Figura 14- Morfologia externa das minhocas (A) e principais órgãos do sistema gastrointestinal e suas funções.....	55
Figura 15- Detalhe das cerdas presentes em cada metâmero do animal.....	56
Figura 16- Aspectos gerais relacionados com a parede corporal da minhoca, tegumento e camada muscular.....	60
Figura 17- Aspectos filogenéticos relacionados a evolução do sistema nervoso nos diferentes grupos taxonômicos animais e da estrutura ganglionar do sistema nervoso central das minhocas.....	61
Figura 18- “Enovelamento” da minhoca quando as condições ambientais são negativas.....	66
Figura 19 - Arco-reflexo de fuga de minhocas.....	68

Figura 20 -A cavidade celômica da minhoca é preenchida por líquido e um conjunto de células denominadas celomócitos e células clorogênicas e leucócitos.....	71
Figura 21 - Delineamento geral do estudo translacional.....	75
Figura 22 - Ensaio de fuga rápida de minhocas.....	76
Figura 23 : Resumo Geral desta Tese.....	163

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT3: Receptor três de serotonina
AA: Alanina Alanina
AchE: Acetilcolesterase
ACTH: Hormônio adenocorticotrófico
Ala-SOD2: Alanina Superoxido Dismutase dois
ATP: Adenosina Trifosfato
AV: Alanina Valina
AVT: Área Tegumental Ventral
BDNF: Do inglês, Brain Derived Neurotrophic Factor
CAT: Catalase
CCF: fator citolítico de celomócitos
CMF: fator mitogênico de celomócitos
CMSPs : Células mononucleares do sangue periférico
CRH: Hormônio Liberador de corticotropina
CSC: Células sensoriais centrais
DAMPs: do inglês, *Damage-associated molecular pattern*
DCNTs: Doenças Crônicas Não-Transmissíveis
DHEA: Desidroepiandrosterona
DM 2: Diabetes Mellitus tipo dois
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EINs: Espécies Intermediárias de Nitrogênio
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
EVPEs: Eventos de Vida Produtores de Estresse
GABA: Ácido gama-aminobutírico
GCT: Aminoácido Alanina
GPX: Glutathione Peroxidase
GSK-3 β : Glicogênio sintase quinase três beta
GTT: Aminoácido Valina
HaCAT: Linhagem celular de queratinócitos
H2O2: Peróxido de Hidrogênio
HPA: do inglês, Hipófise Pituitária Adrenal
LDL: do inglês, *Low Density Lipoproteins*
IL-1: Interleucina um
IL-2: Interleucina dois
IL-10: Interleucina dez
ISO: International Organization for Standardization
MHC: do inglês, *Major histocompatibility complex*
MnSOD: Superóxido Dismutase dependente de manganês
MTS- do inglês, *Mitochondrial Target Sequence*
NAc: Núcleo accumbens
NaCl: Cloreto de Sódio
NET: do inglês, *neutrophil extracellular traps*
NK: células natural-killer
O2•- : Ânion Superóxido
OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*
OH•: Radical Hidroxila
S-HP: Superóxido- Peróxido de Hidrogênio
SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*

SOD-2: Superóxido Dismutase dois

TCC: Terapia Cognitiva Comportamental

TEPT: Transtorno de estresse pós-traumático

TNF- α : do inglês, *Tumor necrosis factor*

Val16Ala-SOD2: Valina dezesseis Alanina Superóxido Dismutase dois

Val-SOD2: Valina Superóxido dismutase dois

VV: Valina Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo Geral.....	17
1.2.2 Objetivos Específicos.....	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E AS DOENÇAS CRÔNICAS NÃO- TRANSMISSÍVEIS	18
2.1.1 Depressão maior e envelhecimento	18
2.2 RESILIÊNCIA PSICO-COMPORTAMENTAL	20
2.3 ESTRESSE E A SÍNDROME GERAL DE ADAPTAÇÃO	21
2.4 BASES CITO-FISIOLÓGICAS DO ESTRESSE PSICOSSOCIAL: REGULAÇÃO DO EIXO HPA	26
2.5 EFEITO DO CORTISOL NO METABOLISMO CORPORAL	30
2.6 NEUROANATOMIA DA RESPOSTA AO ESTRESSE CRÔNICO PSICOSSOCIAL .	31
2.7 IMPACTO DO ESTRESSE CRÔNICO DE ORIGEM PSICOSSOCIAL NA FISIOLOGIA E HOMEOSTASE CORPORAL.....	33
2.7.1 Impacto do estresse psicossocial crônico, nos metabolismos de carboidratos, lipídios e oxidativo	33
2.7.2 Estresse psicossocial crônico e o envelhecimento celular	36
2.7.3 Estresse psicossocial crônico e autofagia	37
2.7.4 Estresse psicossocial crônico, estresse oxidativo e inflamação crônica de baixo grau..	39
2.8 POTENCIAL ASSOCIAÇÃO ENTRE RESILIÊNCIA AO ESTRESSE PSICO- COMPORTAMENTAL E O DESBALANÇO OXIDATIVO SUPERÓXIDO-PEROXIDO DE HIDROGÊNIO (S-PH).....	43
2.8.1 O Polimorfismo Genético Val16Ala-SOD2	44
2.9 MINHOCA CALIFORNIANA COMO MODELO <i>IN VIVO</i> DO DESBALANÇO FARMACOLÓGICO SUPEROXIDO-PEROXIDO DE HIDROGÊNIO NA MODULAÇÃO OXI-INFLAMATÓRIA E DA RESPOSTA AO ESTRESSE.....	50
2.9.1 Bioecologia das minhocas.....	50
2.10 O DESBALANÇO SUPEROXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA OXIDATIVA, IMUNE E DE RESILIÊNCIA DE MINHOCAS	69
2.11 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL.....	71

3	RESULTADOS	74
3.1	ARTIGO 1	75
3.2	ARTIGO 2	87
3.3	ARTIGO 3	102
4	DISCUSSÃO	153
5	CONCLUSÃO/ CONSIDERAÇÕES FINAIS	162
	APENDICE A- CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO RELACIONADO A TESE	179
	APENDICE B: ARTIGO PUBLICADO COMO PRIMEIRO AUTOR NÃO RELACIONADO A TESE	180
	APENDICE C: ARTIGO PUBLICADO COMO PRIMEIRO AUTOR NÃO RELACIONADO A TESE	181
	ANEXO A- ESCALA GDS	182

1 INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento populacional aumentou a prevalência de indivíduos portadores de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs). DCNTs são entidades patológicas complexas associadas a diversos tipos de fatores de risco. Evidências epidemiológicas e experimentais têm sugerido que, não só variáveis do estilo de vida, como o sedentarismo e o tabagismo são fatores de risco relevantes as DCNTs. A exposição ao estresse psicossocial crônico também contribui para o risco de desenvolvimento destas DCNTs, em especial a depressão (RISHWORTH E ELLIOTT, 2018; STOJANOVICH e MARISAVLJEVICH, 2007; YANG et al., 2019).

Na psiquiatria, a depressão maior é um dos transtornos mais prevalentes e dispendiosos no seu tratamento, sendo altamente prevalente em idosos. A exposição ao estresse psicossocial crônico é um dos principais fatores de risco, principalmente em idosos, estando associada a altas taxas de suicídio (OUDE VOSHAAR et al., 2016; MALHI E MANN, 2018; ROGERS et al., 2018). Entretanto, evidências sugerem que o desenvolvimento da depressão ou DCNTs somáticas em decorrência da exposição ao estresse psicossocial é influenciado por fatores genético-ambientais individuais. Ou seja, indivíduos expostos a um mesmo evento estressante podem vir ou não a desenvolver estados depressivos, dependendo de como a pessoa “percebe este estresse” (MICHALSKI et al., 2017). Para identificar esta variação na resposta ao estresse psicossocial ou comportamental foi criado o termo resiliência. A resiliência diz respeito a capacidade de um indivíduo se adaptar com sucesso a uma situação de exposição ao estresse, trauma ou adversidade, diminuindo a chance de desenvolvimento de depressão maior, estresse pós-traumático e ansiedade, ou mesmo de outras DCNTs (FEDERENKO et al., 2006; MICHALSKI et al., 2017). Por este motivo, muitos pesquisadores consideram que centenários seriam indivíduos com grande resiliência porque, mesmo que não escapem do declínio fisiológico ou de doenças associadas a idade, a taxa destas morbidades é mais lenta devido a sua a capacidade intrínseca aumentada em responder e se adaptar a pequenos estresses da vida diária (BORRAS et al., 2020).

Dada a sua grande relevância clínica muitas pesquisas têm voltado a sua atenção para entender a neurobiologia da resiliência. Evidências descreveram que a modulação da resiliência envolve a ação de circuitos neurais do córtex pré-frontal medial; circuito de recompensa no cérebro via neurônios dopaminérgicos e do hipocampo que está diretamente associado ao funcionamento do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA). No caso, o eixo HPA é o responsável pela modulação dos hormônios do estresse, em especial o cortisol que é produzido a partir das glândulas suprarrenais (LIU et al., 2018).

Estudos adicionais sugerem que a baixa resiliência e a depressão estariam associadas a estados oxidativos e inflamatórios crônicos (ASCHBACHER et al., 2013; MAJD et AL., 2020). Esta sugestão é reforçada por outras evidências que sugerem que indivíduos com grande longevidade apresentariam um estado de inflamação crônica menos intenso (BORRAS et al., 2020). Dentro deste panorama, parece que as diferenças iniciais nos processos oxidativos e inflamatórios seriam determinantes na resposta do indivíduo a exposição a o estresse crônico (YEGOROV et al., 2020), sua maior ou menor resiliência e no estabelecimento e manutenção de estados depressivos (MÉNARD et al., 2017; KALINICHENKO et al., 2019; MAJD et AL., 2020).

Porém uma questão que ainda está em aberto é se indivíduos com suscetibilidade genética a apresentarem estados inflamatórios crônicos poderiam ter resiliência diminuída e maior risco de depressão maior. Este poderia ser o caso de polimorfismos associados ao aumento nos níveis do ânion superóxido que, junto com o óxido nítrico, é notadamente uma molécula relacionada a resposta inflamatória (GUZIK et al., 2003). Nesse caso, níveis basais elevados do ânion superóxido poderiam aumentar a suscetibilidade a baixa resiliência e a depressão. Para contribuir na elucidação desta questão este estudo desenvolveu três investigações complementares. Dois estudos envolvendo seres humanos e um estudo envolvendo modelo animal. No caso, é importante destacar que o uso de modelos animais para este tipo de estudo fornece uma abordagem crucial para examinar os circuitos neurais e as vias moleculares e celulares em um ambiente controlado o que não é possível de ser realizado com seres humanos (WANG et al., 2017).

Duas investigações envolveram o polimorfismo humano rs4880 localizado no gene da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2), no qual o genótipo AA tem possui níveis basais aumentados da espécie reativa de oxigênio (EROs) peróxido de hidrogênio estando associado ao risco de diversos tipos de câncer (BRESCIANI et al., 2013; 2015). Por outro lado, o genótipo VV parece aumentar os níveis basais do ânion superóxido contribuindo assim para o desenvolvimento de estados oxidativos e inflamatórios crônicos (MONTANO et al., 2012; BARBISAN et al., 2017) que levam ao aumento do risco de algumas DCNTs como a obesidade (MONTANO et al., 2009), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010) entre outras. Alguns estudos prévios também indicaram que este polimorfismo estaria associado a maior risco de depressão (GALAECKI et al., 2010; PIETRAS et al., 2010; WIGNER et al., 2018).

A terceira investigação envolveu estudos no modelo experimental *Eisenia fétida* (minhoca californiana vermelha). Esta investigação foi baseada na seguinte premissa: se níveis

não controlados do ânion superóxido podem contribuir para mudança no comportamento associado a exposição a algum tipo de estresse ambiental, este efeito também poderia ser observado em outras espécies animais, incluindo invertebrados com sistema nervoso central de baixa complexidade, como é o caso das minhocas. Minhocas pertencem ao Filo Annelida que é o primeiro onde se observa a presença de sistema nervoso central do tipo ganglionar (cérebro) na escala evolutiva. Estas espécies são amplamente utilizadas em testes de ecotoxicidade bem estabelecidos porque, têm a capacidade de reconhecer elementos tóxicos e desencadear comportamentos de evitação que indicam a presença de contaminantes nos solos (SIMPSON et al., 2009; SHI et al., 2017). Um desbalanço oxidativo induzido pela exposição a rotenona, que aumenta os níveis de superóxido e a porfirina que aumenta os níveis de peróxido podem mudar comportamentos de evitação e fuga reduzindo assim a chance de sobrevivência destes animais. Estas alterações podem assim representar um modelo experimental de baixa resiliência. Além disto, o sistema imune inato das minhocas guarda muitas similaridades com o sistema imune humano, e é de fácil acesso, sem a necessidade de sacrificar o animal (ENGELMANN et al., 2016; HOMA, 2016). O acesso ao fluido celômico, rico em células imunes permite então análises relacionadas a modulação de marcadores oxidativos e inflamatórios relacionados ao desbalanço farmacológico superóxido-peróxido de hidrogênio (S-HP), previamente descrito em modelos *in vitro* (BERTO et al., 2015; AZZOLIN et al., 2016).

Acredita-se que o desenvolvimento destes estudos possa contribuir para o entendimento do quanto o desbalanço oxidativo e inflamatório afetam padrões de resiliência servindo como base para o desenvolvimento posterior de estratégias terapêuticas integradas farmacológicas e não-farmacológicas, em especial as que envolvem terapias cognitivo comportamentais (TCC) (LIU et al., 2017).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Averiguar através de um estudo translacional, a influência genética desbalanço S-HP na modulação de indicadores de resiliência através de estudos populacionais envolvendo o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e no modelo experimental *E.fetida*.

1.2.2 Objetivos Específicos

Artigo 1:

Analisar a associação entre o polimorfismo genético Val16Ala-SOD2 e indicadores de baixa resiliência em idosos via autopercepção de exposição ao estresse psicossocial e depressão em idosos quem vivem em comunidade avaliando a influência:

- do sexo, idade e perfil socioeconômico e cultural nesta associação;
- do estilo de vida e história prévia de DCNTs;
- polifarmácia e principais categorias de fármacos diariamente utilizados.

Artigo 2:

Comparar os níveis basais de moléculas relacionadas a resposta ao estresse e a função neural em adultos jovens saudáveis sem histórico de exposição ao estresse crônico ou transtornos psiquiátricos portadores de diferentes genótipos ou alelos do polimorfismo Val16Ala-SOD2.

Artigo 3:

Analisar a influência do desbalanço S-HP farmacologicamente induzido em minhocas californianas pela exposição a rotenona que mimetiza um fenótipo VV-like, e a porfirina (que mimetiza um genótipo AA-like):

- na modulação de marcadores do estresse oxidativo (lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e dano de DNA);
- nos seguintes marcadores de imunocompetência e resposta inflamatória: distribuição e taxa de proliferação de células do sistema imune das minhocas (celomócitos);
- na eficiência da resposta antimicrobiana via modulação da expressão do gene do receptor Toll-like (EaRTL) e do gene peptídeo antimicrobiano (AMP), da produção de armadilhas extracelulares de DNA-proteínas (NETs) e corpos marrons (encapsulamento);
- alteração de comportamentos que indicam baixa resiliência (sobrevivência) relacionados a exposição a situações de estresse hídrico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENVELHECIMENTO POPULACIONAL E AS DOENÇAS CRÔNICAS NÃO-TRANSMISSÍVEIS

Nos últimos 200 anos, modificações demográficas experimentadas em países desenvolvidos, e posteriormente em países em desenvolvimento onde se inclui o Brasil têm levado a um aumento na expectativa de vida humana. Este fenômeno é conhecido como “envelhecimento populacional” estando diretamente relacionado com as quedas nas taxas de fertilidade (número de filhos por mulher em idade fértil) e da mortalidade infantil (até 4 anos de idade) em decorrência das melhorias socioeconômicas, culturais e do manejo da saúde (RISHWORTH E ELLIOTT, 2018). O aumento na frequência de idosos na população também levou a um acréscimo na prevalência de disfunções e DCNTs que geram alto custo econômico e social devido a sua grande carga de morbimortalidade (ENGELGAU et al., 2011).

Assim, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, as principais causas de mortalidade são as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, osteomusculares e os diversos tipos de câncer. Além destas DCNTs os transtornos psiquiátricos, em especial a depressão maior possui alta prevalência na população idosa (MENDES et al., 2012; VERAS E OLIVEIRA, 2018; RISHWORTH E ELLIOTT, 2018).

2.1.1 Depressão maior e envelhecimento

Além dos fatores de risco a DCNTs associados ao estilo de vida, como o sedentarismo e a superalimentação (WOO, 2017), nas últimas décadas o papel do estresse crônico de origem psicossocial tem emergido como um potencial fator de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, em especial a depressão maior, que está associada ao risco de diversos tipos de DCNTs incluindo doença de Alzheimer (MACHADO et al., 2014), de osteoporose (AZUMA et al., 2015), doenças cardiovasculares (STEPTOE E KIVIMÄKI, 2012; KIVIMÄKI e STEPTOE et al., 2018) e alguns tipos de câncer com destaque ao câncer de mama (PAYNE, 2014; CHIRIAC et al., 2018).

A depressão é uma enfermidade psiquiátrica que afeta desde jovens a idosos. A prevalência de depressão tem aumentado de maneira constantemente nos últimos 10 anos, de 6,6% para 7,3% em adultos e 8,7% a 12,7% em adolescentes (WEINBERGER et al., 2017). O risco de depressão ao longo da vida é três vezes maior (15-18%), com quase uma em cada cinco pessoas

experimentando um episódio em algum momento de suas vidas. Em termos epidemiológicos estima-se que uma em cada quatro mulheres e um em cada seis homens experimentam depressão ao longo da vida e até 65% dos indivíduos apresentam episódios recorrentes deste distúrbio (KESSLER et al., 2010). Para agravar o problema, muitas pessoas com depressão nunca recebem diagnóstico ou tratamento, e apenas cerca de 30% a 35% dos adultos alcançam remissão usando as abordagens terapêuticas atuais. Deste modo, cerca de dois terços dos pacientes permanecem com sintomas depressivos, muitas vezes altamente incapacitantes (ALEXOPOULOS, 2005 ; ROOSE E SCHATZBERG, 2005; DAN CHISHOLM et al., 2004).

Nos idosos a prevalência de depressão é bastante alta, sendo que mulheres mais idosas têm maior probabilidade de sofrer este tipo de transtorno psiquiátrico. Por outro lado, os impactos relacionados à mortalidade por problemas de saúde mental, incluindo suicídio, são mais graves para homens mais velhos (KIELY et al., 2019). De fato, o envelhecimento biológico pode ser, por si mesmo uma experiência estressante em decorrências das múltiplas perdas que o indivíduo que envelhece vivencia. Entre estas estão as perdas financeiras, psicossocial e pessoais, declínio na saúde, independência, e das habilidades cognitivas e funcionais. Especialmente no Brasil, onde existe uma valorização excessiva da aparência corporal, A imagem corporal da velhice é representada pelo declínio físico e visível, e a dificuldade em aceitar este fato induz à existência de um eu visível, que envelhece, e um eu invisível, que se mantém jovem, gerando muitas vezes estresse (BLESSMANN, 2004).

Portanto, o envelhecer se constitui em um período de conflitos e mudanças tanto no aspecto fisiológico quanto no social (DZIECHCIAŻ e FILIP, 2014; SCHWAN et al., 2019). A este respeito, Pereira et al., (2004) comentaram que: “Na sociedade de consumo em que vivemos, onde o valor social prioritário é o poder econômico, o idoso é discriminado e excluído por não ser mais produtivo, nem se integrar aos padrões de beleza e juventude culturalmente valorizados”. Assim, a depressão é considerada uma das maiores causas de sofrimento emocional no final da vida e também pode ser um fator contribuinte para a morbidade de muitos distúrbios clínicos. Os idosos deprimidos geralmente experimentam funções e qualidade de vida acentuadamente diminuídas bem como sintomas de humor, também apresentam maior risco de suicídio. Entretanto, mesmo que seja prevalente em idosos, é importante destacar que a depressão clínica não faz parte do envelhecimento normal. Neste sentido, ela pode e deve ser prevenida ou tratada nas pessoas com idades mais tardias. Atualmente, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da depressão é a exposição ao estresse psicossocial crônico, no qual alguns indivíduos são mais suscetíveis que outros (CASEY, 2017).

2.2 RESILIÊNCIA PSICO-COMPORTAMENTAL

Os níveis de saúde física e mental são importantes contribuintes para o bem-estar subjetivo ao longo e no final da vida. Deste modo, considera-se o envelhecimento bem-sucedido como uma maneira de conceituar o bem-estar geral em idosos. Ou seja, o envelhecimento bem-sucedido não é apenas longevidade ou ausência de doença ou incapacidade, mas inclui vários estados de bem-estar que possui múltiplos determinantes (MOORE et al., 2015). Existem vários modelos teóricos relacionados ao envelhecimento bem-sucedido, entre os quais está o modelo proposto por Doyle et al., (2012), que considera a existência de componentes objetivos e subjetivos, incluindo aptidão funcional, saúde e traços psicológicos, com ênfase especial ao engajamento social e a resiliência.

A resiliência é considerada a capacidade do indivíduo se recuperar de uma variedade de desafios que podem surgir ao longo da sua vida. Deste modo, como o indivíduo lida com os eventos estressante que ocorre ao longo da sua vida pode influenciar o papel desta variável no seu envelhecimento. Neste contexto, tem sido sugerido que o estresse psicossocial percebido tem uma relação bidirecional com a saúde e o bem-estar das pessoas, em especial dos idosos (MITSONIS et al., 2009; MOORE et al., 2015). Ou seja, problemas de saúde e sensação de bem-estar ruim podem ser excepcionalmente estressantes para uma pessoa, bem como situações de estresse crônico psicossocial podem aumentar o risco ou mesmo desencadear disfunções e DCNTs (STOJANOVICH, 2010; WU et al., 2018).

Além destas doenças de origem somática, como já foi anteriormente comentado, o estresse crônico e sua percepção também está altamente associado ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, com destaque a depressão e ao transtorno generalizado de ansiedade (VINKERS et al., 2014; ANDREESCU E VARON, 2015; DING E DAI 2019). A resiliência parece ser mediada pela ausência de certas moléculas-chave que ocorrem em animais suscetíveis e prejudicam sua capacidade de enfrentamento e pela presença de mecanismos de adaptação distintos observados em indivíduos resilientes que promovem o comportamento normal (KRISHNAN et al., 2007 ; FRIEDMAN et al., 2016).

Diversas estruturas cerebrais parecem estar envolvidas com a modulação da resiliência. Liu et al., (2018) na sua revisão sobre o tema destacaram que a resiliência envolve: (1) circuitos neurais do córtex pré-frontal medial que exercem forte controle negativo sobre as vias da resposta ao estresse emocional. Assim, existe uma associação forte entre hipoatividade no córtex pré-frontal e pacientes deprimidos, por exemplo; (2) alterações no circuito de recompensa no cérebro, que compreende neurônios dopaminérgicos da área tegumental ventral

(AVT) que se projetam até o núcleo accumbens (NAc). Este circuito VTA-NAc é crucial para a motivação da recompensa e, quando alterado está associado ao comportamento aditivo. Entretanto, existem evidências de que alterações neste circuito também têm um papel importante na mediação da suscetibilidade ao estresse (3) atividade do hipocampo, que é uma das principais áreas do cérebro que exerce controle regulatório sobre o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA), que é o responsável pela produção dos hormônios do estresse, em especial o cortisol.

2.3 ESTRESSE E A SÍNDROME GERAL DE ADAPTAÇÃO

Para se entender melhor o significado da resiliência e seu impacto nos transtornos psiquiátricos como a depressão é de grande relevância revisar os aspectos neurofisiológicos relacionados a resposta ao estresse agudo e crônico. O estresse comportamental é geralmente, um fenômeno transiente que ocorre nos animais superiores incluindo seres humanos, e que pode ser genericamente definido como uma resposta a uma ameaça real ou antecipada de bem-estar ou interrupção da homeostase do organismo. Este tipo de alteração fisiológica frente a um perigo é considerado altamente adaptativa para a sobrevivência tanto dos animais e dos seres humanos (MCEWEN et al., 2015).

Embora a sensação e reação ao estresse tenha evoluído nos animais, a fim de promover adaptação a possíveis ameaças ambientais, o estilo de vida moderno fez com que a exposição ao estresse, que antes era eventual e definido por elementos concretos, como medo a predação, a variações meteorológicas, a confrontos entre grupos, passe ocorrer de modo crônico. Por este motivo, atualmente o estresse psicossocial crônico vivenciado em determinadas situações, ou em decorrência do envelhecimento é reconhecido como uma questão importante na pesquisa básica e clínica em neurociência e psicologia (MCEWEN et al., 2015).

A identificação do estresse psicossocial como um fator importante para a saúde humana foi impulsionada em 1946 pelo trabalho publicado por Seyle, denominado “*The Stress of Life*” baseado em experimentos que realizou em laboratório. Neste trabalho o autor desenvolveu o conceito de “Síndrome Geral de Adaptação” baseado na ideia de que situações que geram estresse (principalmente continuadas) podem aumentar o risco de desenvolvimento de diversas DCNTs incluindo os transtornos mentais. Esta concepção vem sendo corroborada por um grande conjunto de evidências científicas (McEWEN E MORRISON, 2013; FONKEN et al., 2018; GODOY et al., 2018).

A Síndrome Geral de Adaptação desenvolve-se em três etapas (SELYE et al., 1984):

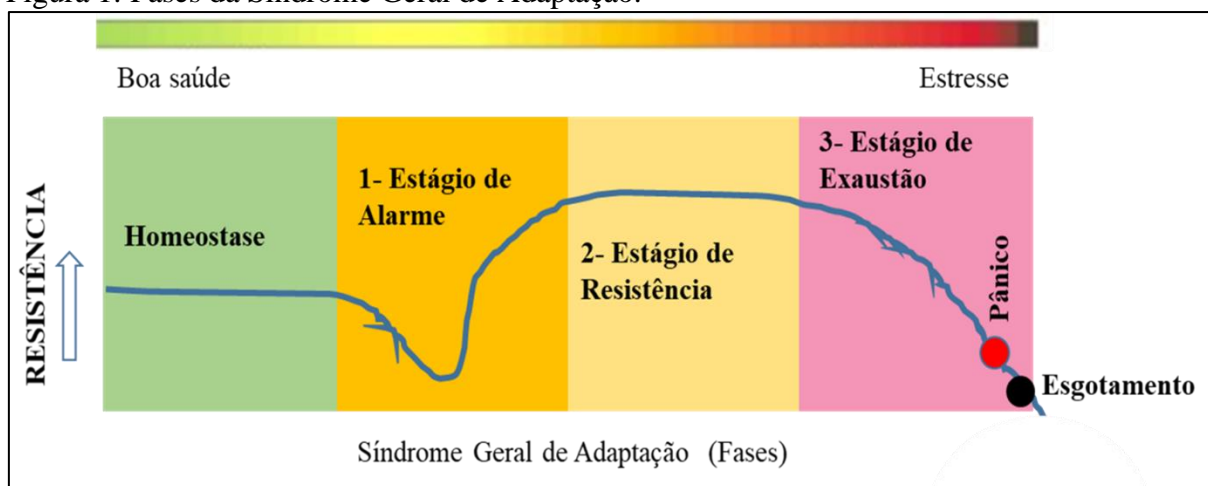
Fase de Alerta – nesta fase estímulos agressores desencadeiam uma resposta rápida do organismo preparando-o para a luta ou fuga. Esta fase é intensa não sendo possível ser mantida por muito tempo. Esta fase termina quando ocorre restauração da homeostase corporal em níveis similares aos existentes antes da exposição ao estresse.

Fase de Resistência – no caso em que ocorra exposição continuada ao estresse, o organismo começa a ficar mais desgastado. Por este motivo aparecem as primeiras consequências físicas, mentais e emocionais relacionadas a exposição crônica ao estresse. Entre estas podem ocorrer maior suscetibilidade a doenças, dificuldades de memória. Neste caso, o indivíduo precisa recorrer a mecanismos de controle do estresse como estratégia para sair desta fase.

Fase de Exaustão: quando a exposição crônica ao estresse persiste, sintomas de exaustão passam a ser percebidos como: irritabilidade, dificuldade para relaxar, alterações do sono, isolamento social, queda de cabelo, baixa autoestima, aumento nos níveis séricos de glicose e colesterol, dificuldades sexuais, entre outras. A permanência na fase de exaustão, predispõe o indivíduo ao estabelecimento de enfermidades mais graves. No caso, a síndrome geral de adaptação pode levar a hiperplasia do córtex da suprarrenal, atrofia dos órgãos linfáticos, ao desenvolvimento de úlceras gastrointestinais, além de perda de peso e outras alterações fisiológicas e neuropsicológicas que predispõe ao aparecimento de DCNTs em especial, as doenças cardiovasculares e os transtornos psiquiátricos.

A Figura 1 abaixo, ilustra as etapas acima comentadas da síndrome geral de adaptação.

Figura 1: Fases da Síndrome Geral de Adaptação.



Fonte: O autor

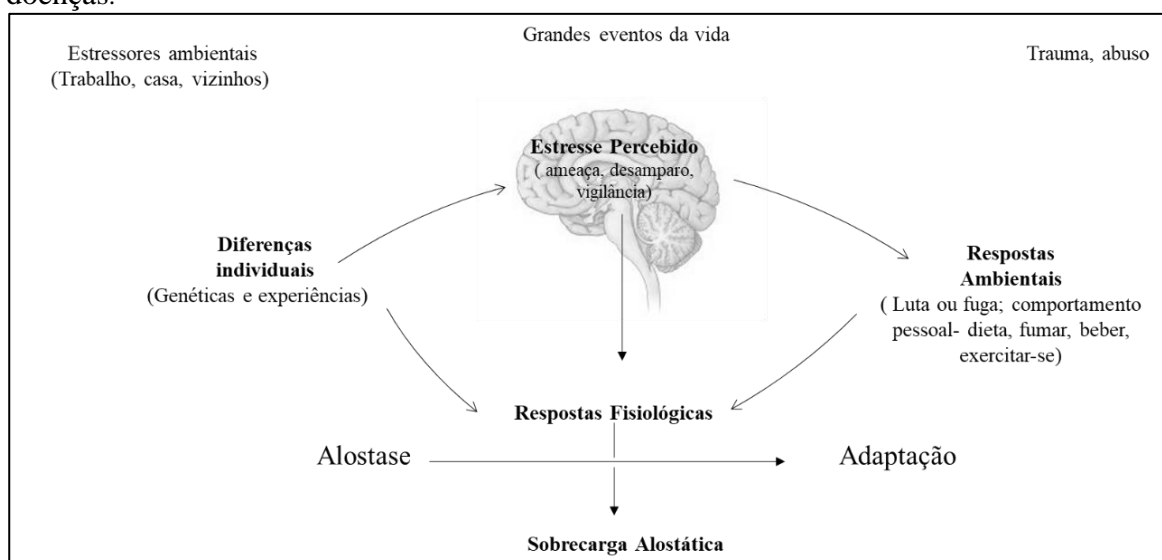
Na revisão de Godoy et al., (2018) os autores comentaram que nas últimas décadas os conceitos iniciais do estresse têm sido revisitados, levando a ampliação do conceito de “homeostase” para o conceito de “alostase”. Com base na chamada “teoria alostática” proposta por Peter Sterling, a partir de estudos conduzidos nas décadas de 60, 70 e 80, foi proposto os conceitos de carga alostática e sobrecarga alostática em relação ao estresse (STERLING E EYER, 1988; MCEWEN E STELLAR, 1993; SCHULKIN et al., 1994) que serão comentados a seguir.

Já é sabido que os sistemas que regulam a homeostase corporal visam sempre o reestabelecimento da constância do meio interno do organismo (equilíbrio dinâmico) (MCEWEN e WINGFIELD, 2003). Porém, podem ocorrer desafios desencadeados pelo ambiente social, físico ou ambos, de maneira inesperada ou crônica, que ultrapassam os limites de intensidade, previsibilidade e duração. Isto faz com que exista a necessidade de uma regulação em outro nível, já que não é possível retornar completamente ao estado de homeostase. Assim, o conceito de alostase está baseado na concepção de que o organismo irá buscar se adaptar a estas novas condições. Entretanto, este processo gerará um “custo fisiológico” para o ajuste a esta nova situação socioambiental (GODOY et al., 2018).

Diferente da homeostase que prioriza a regulação do meio interno por mecanismos de retroalimentação negativa, a alostase, ou os sistemas algostáticos considera relevante a retroalimentação positiva que atua via ajustes antecipatórios que podem funcionar em diferentes sistemas fisiológicos. Nesse sentido, os sistemas alostáticos conseguem identificar e corrigir erros e dividir recursos entre os sistemas fisiológicos para evitar a exaustão dos mesmos. Entretanto esta adaptação acarreta um custo energético ao organismo denominado “sobrecarga

alostática” que pode aumentar o risco de desenvolvimento de morbidades físicas e mentais. Entretanto, se o custo de ativação dos mecanismos alostáticos for demasiado alto, o que pode ocorrer em situações de estresse prolongado pode ser desencadeado o que McEwen e Wingfield (2010) denominaram de “falha alostática”. Esta falha ocorre pela incapacidade de o indivíduo ativar os sistemas alostáticos diante de uma demanda prolongada, o que levar ao desenvolvimento de processos patológicos, já que o organismo não consegue responder adequadamente a exposição crônica a um determinado agente estressor (Figura 2).

Figura 2- Percepção do estresse é influenciada pelas experiências, pela genética e pelo comportamento do indivíduo. Quando o cérebro percebe uma experiência como respostas estressantes, fisiológicas e comportamentais são iniciadas, levando à alostase e adaptação. Com o tempo, a carga alostática acumulada e a superexposição a mediadores de estresse neural, endócrino e imunológico podem ter efeitos adversos em vários órgãos sistemas levando a doenças.



Fonte: Adaptada de McEwen, 1998.

Entretanto, cabe salientar que o conceito de alostase não é universalmente aceito, já que alguns autores argumentam que o uso do termo alostase seria apenas uma mudança semântica em relação a homeostase, uma vez que o sistema de resposta alostática é o mesmo sistema biológico estudado na resposta homeostática (SOUSA et al., 2015; GODOY et al., 2018). Como os conceitos de estresse, agente estressor e resposta ao estresse ainda são amplamente utilizados pela comunidade científica (GODOY et al., 2018) no presente estudo os mesmos também serão utilizados.

Com base na síndrome geral de adaptação foi possível reconhecer a existência de diversas situações que são conhecidas como “Eventos de Vida Produtores de Estresse” (EVPEs), que geram estresse crônico. Estes eventos são altamente prevalentes nas pessoas

idosas. Este é o caso da ocorrência de doenças graves, hospitalização, dificuldades financeiras, mudança forçada de moradia, luto, exposição a agressão física e emocional continuada, vivência de roubo ou assalto, e também ser cuidador de pessoa com morbidades e disfunções crônicas que demandam alta carga de atenção, como é o caso dos pacientes demenciados. Situações de estresse mais comuns em indivíduos adultos jovens são a ruptura de relacionamentos amorosos e problemas de assédio moral no trabalho (LOPES et al., 2003). Independentemente do tipo de EVPEs que a pessoa está exposta evidências têm descrito que as mesmas estão associadas com o risco de desenvolvimento de uma ampla gama de doenças, como esquizofrenia, depressão, infarto do miocárdio, câncer, doenças autoimunes, demência do tipo Alzheimer tardio em idosos entre outros (PIIRAINEN et al., 2017; FONKEN et al., 2018; GODOY et al., 2018).

Apesar da grande quantidade de estudos envolvendo os EVPEs conduzidos ao longo da década de 1970, foi na década de 80 que Lazarus e Folkman postularam que não são os eventos de vida em si e por si que levam ao estresse patológico. No caso é a avaliação que o indivíduo faz das situações por que passa e as diferenças ambientais, orgânicas e psicológicas que terão um importante papel mediador (LAZARUS E FOLKMAN, 1984). Esta descoberta acabou alterando o rumo das pesquisas, e as fontes de estresse passaram a serem categorizadas em dois grupos: (1) fontes internas, como é o caso de pensamentos e sentimentos negativos, nocivos e (2) fontes externas, como as previamente citadas (PEREIRA et al., 2004). No caso, pode-se dizer que o estresse e suas consequências são gerados principalmente a partir da interação de fatores socioambientais e genéticos. Os fatores genéticos poderiam atuar minimizando o impacto negativo do estresse no organismo, ou ao contrário potencializando o mesmo (GODOY et al., 2018).

Entretanto, o entendimento de como estes fatores podem modular o estresse e o seu impacto na saúde, envelhecimento e longevidade humana ainda continua sendo um grande desafio (GODOY et al, 2018), o que enseja a realização de investigações complementares. Estes estudos poderiam ser relevantes não só para se esclarecer alguns aspectos ainda obscuros, principalmente da relação entre estresse socioambiental e envelhecimento, como também para auxiliar no desenvolvimento de terapias cognitivo-comportamentais que poderiam minimizar o impacto do estresse nos idosos. Para tanto se faz necessário aprofundar o entendimento dos principais aspectos citofisiológicos associados a resposta ao estresse.

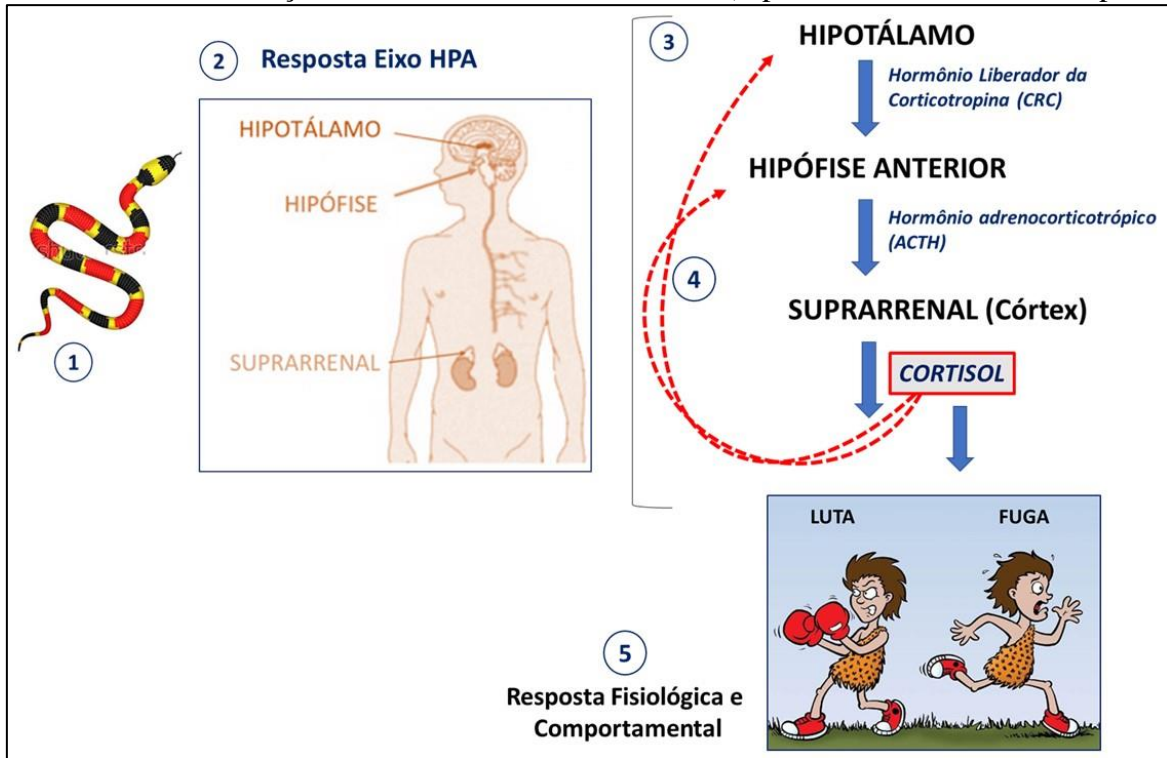
2.4 BASES CITO-FISIOLÓGICAS DO ESTRESSE PSICOSSOCIAL: REGULAÇÃO DO EIXO HPA

Dada a sua relevância clínica, muitos estudos relacionados ao estresse passaram a ser conduzidos a fim de se elucidar as rotas bioquímicas e fisiológicas a ele relacionadas. No início dos anos 70 foi descoberta a existência de uma interação bioquímico-fisiológica entre o hipotálamo e a hipófise relacionada a resposta ao estresse. Esta descoberta foi crucial para a compreensão sobre como ocorria a comunicação entre o cérebro e o corpo, o que permitiu a realização de uma infinidade de investigações que passaram a descrever o significado biológico do estresse e suas respostas (Figura 3) (McEWEN E MORRISON, 2013; CHEN E BARAM, 2016).

Hoje, o eixo HPA é reconhecido como um sistema central na regulação da resposta ao estresse fisiológico e psicossocial. Evidências também têm mostrado que a desregulação do eixo HPA tem grande relevância no desenvolvimento de DCNTs (DE KLOET et al., 2005; MCEWEN et al., 2015). Esta associação entre alterações no eixo HPA e risco DCNTs acontece já que o estresse psicossocial crônico causa efeitos secundários nos sistemas metabólico, imunológico e neurobiológico (MCEWEN, 2000).

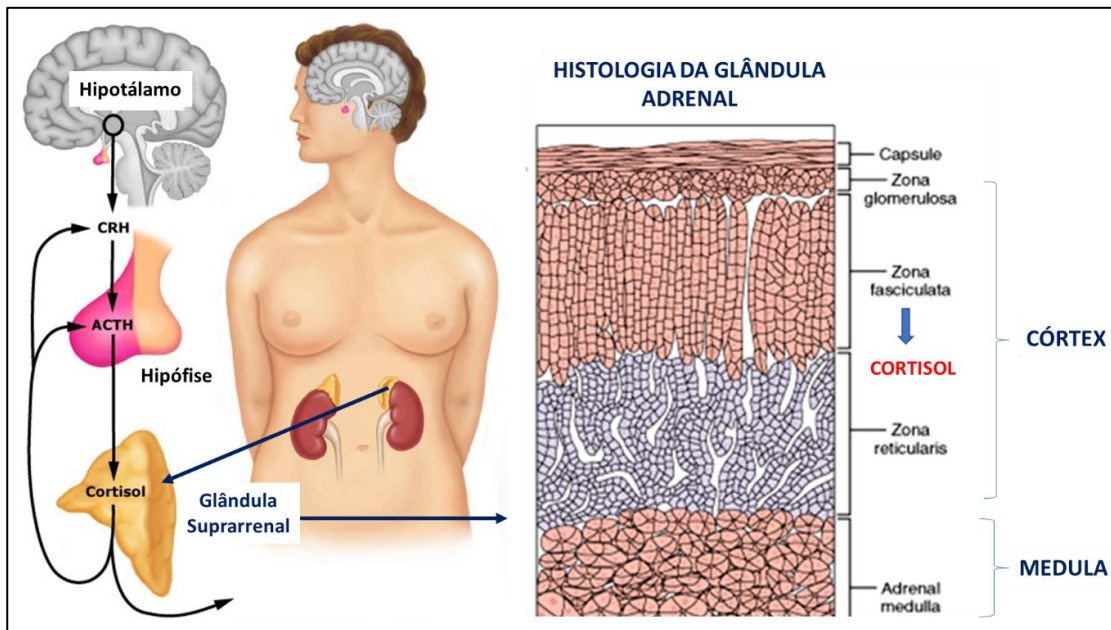
Em termos fisiológicos, o eixo HPA é regulado pela secreção, do hormônio liberador da corticotropina e da vasopressina pelas células do núcleo paraventricular do hipotálamo. Por sua vez, estes dois hormônios têm a capacidade de ativar a secreção do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) que é produzido pela hipófise. O ACTH então age diretamente no córtex da glândula adrenal estimulando a liberação de hormônios glicocorticóides associados a resposta ao estresse que agem sobre diversos tecidos corporais, via receptores específicos (Figura 4). No caso, o principal hormônio glicocorticoide produzido é o cortisol (McEWEN et al., 2015).

Figura 3- Esquema geral de modulação dos níveis de cortisol frente a um agente estressor. (1) Na presença do agente estressor; (2) o eixo HPA; (3) inicialmente o hipotálamo libera o hormônio liberador da corticotropina (CRC) que age na hipófise anterior induzindo a liberação de outro hormônio por esta glândula: hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH, por sua vez age nas células do córtex da glandula suprarrenal fazendo com a mesma produção cortisol que irá mediar a resposta comportamental e fisiológica ao estresse, através de alterações metabólicas e modulação do sistema nervoso autônomo (especialmente o sistema simpático).



Fonte: Esquema montado pelo autor, utilizando imagens livres obtidas na internet

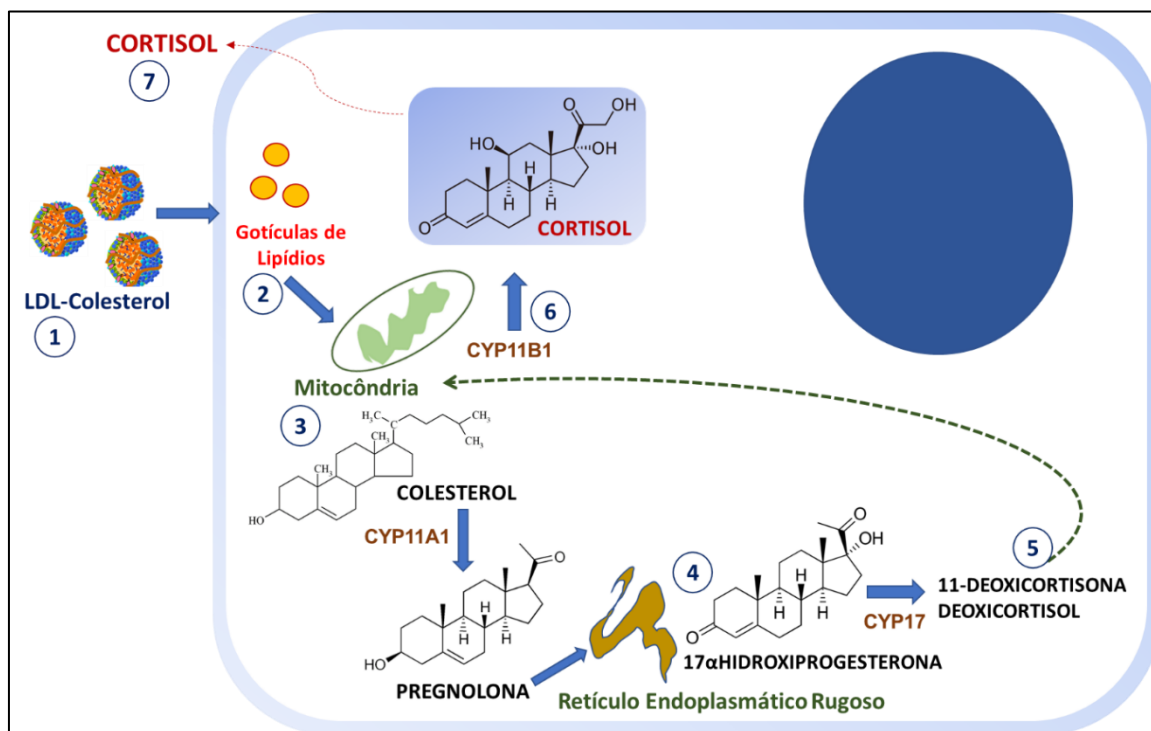
Figura 4- Esquema geral da síntese do hormônio esteroide cortisol pela glândula da adrenal.



Fonte: Esquema montado pelo autor, utilizando imagens livres obtidas na internet

A síntese do cortisol (Figura 5) inicia a partir do colesterol que é esterificado e armazenado sob a forma de gotículas de lipídios dentro do citosol das células da adrenal. É importante comentar que a maior parte deste colesterol é proveniente da lipoproteína de baixa densidade LDL (do inglês, *Low Density Lipoproteins*) colesterol circulante no sangue. O LDL é produzido a partir de gorduras absorvidas no sistema gastrointestinal e que são especialmente processadas no fígado. Dentro das células da adrenal, o colesterol é transportado para o interior da mitocôndria por uma proteína carreadora de esterol. Dentro desta organela, o colesterol é convertido em pregnolona através da ação da enzima citocromo p450ssc onde ssc é um acrônimo para clivagem lateral, P450ssc é uma enzima mitocondrial que catalisa a conversão do colesterol em pregnenolona. Esta enzima também é chamada de CYP11A1. Uma vez que a pregnolona seja produzida, esta molécula vai para o retículo endoplasmático liso onde sofre desidrogenação formando a molécula de progesterona. A partir da própria pregnolona e da progesterona ocorre a síntese da molécula 17- α -hidroxi-progesterona. Via ação da enzima 17-hidrolase também denominada CYP17 são produzidos esteroides intermediários, incluindo as moléculas a 11-deoxicorticosterona e o deoxicortisol. Uma vez sintetizadas, estas moléculas retornam para o interior da mitocôndria onde são hidroxiladas no carbono 11 produzindo corticosterona e o cortisol. Estas reações são catalisadas pela enzima 11 β -hidroxilase também conhecida com CYP11B1 (MCPHEE E GANONG, 2007; McEWEN & BOWLES, 2015).

Figura 5- Mecanismo da síntese da produção de cortisol pelas células do córtex da glândula suprarrenal. (1) colesterol plasmático circulante (principalmente LDL-colesterol) entra para o interior das células; (2) forma gotículas de lipídios que são transportadas para dentro da mitocôndria; (3) dentro desta organela o colesterol é transformado em pregnolona pela ação da enzima citocromo p450 CYP11A1; (4) a pregnolona retorna ao citosol e se acumula no retículo endoplasmático rugoso. Pela ação da CYP17 se transforma em 11-deoxicortisona e deoxicortisol; (5) a deoxicortisona é novamente transportada para o interior da mitocôndria, e finalmente pela ação da enzima CYP11B1 ocorre a produção do cortisol, que é liberado para o citoplasma e posteriormente para a corrente sanguínea.

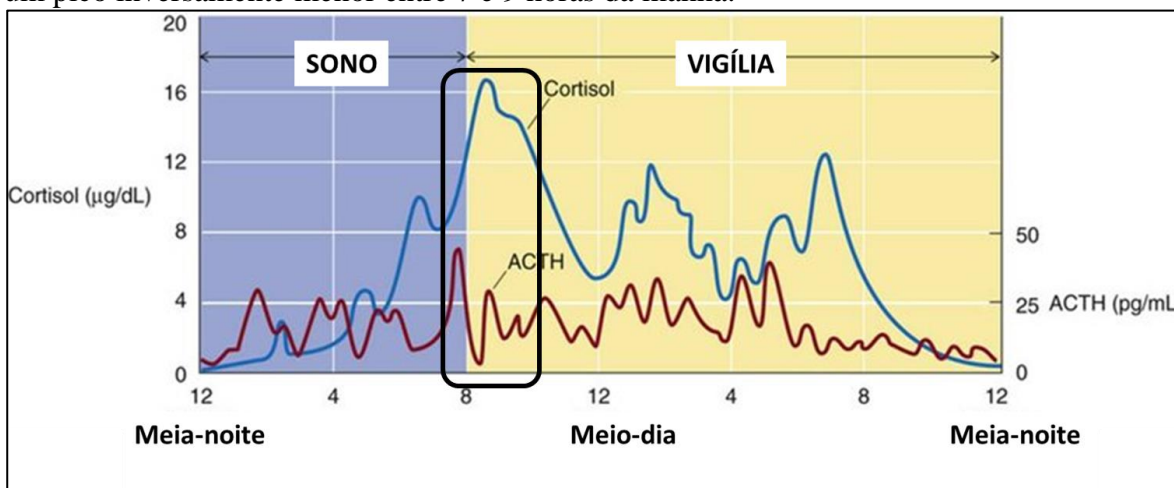


Fonte: Esquema montado pelo autor, utilizando imagens livres obtidas na internet

Uma vez que o cortisol tenha sido sintetizado, esta molécula sofre os seguintes processos metabólicos: 75-80% se transforma em transcortina, 15% se ligam a albumina e apenas de 5-10% do cortisol permanece livre no sangue, sendo esta a sua forma ativa. Este hormônio tem uma meia vida de 70 minutos, e sua metabolização é hepática. Quando o cortisol sai da mitocôndria, esta molécula migra para fora da célula via espaço extracelular e entra na corrente sanguínea. Devido ao seu baixo peso molecular e natureza lipofílica, o cortisol não ligado penetra nas células através da difusão passiva, o que torna viável medir o cortisol livre em muitos fluidos corporais (MCPHEE E GANONG, 2007; CHEN et al., 2016). Assim, por sua propriedade lipofílica o cortisol ativo pode se diluir em outros líquidos incluindo a saliva, onde pode ser quantificado.

Apesar dos níveis de cortisol aumentarem quando o organismo é exposto a um agente estressor cotidianamente o cortisol é produzido, mas concentração deste hormônio varia durante as diversas fases do dia (ritmo circadiano) (Figura 6). Evidências mostraram que cortisol é liberado ao longo do dia com um padrão caracterizado por uma grande elevação nos seus níveis após 30 minutos do despertar. A seguir os níveis de cortisol começam a diminuir (ADAM E KUMARI, 2009). A modulação circadiana do cortisol ao longo do dia é de vital importância porque permite que, pela manhã os indivíduos estejam mais ativos e vigilantes a situações estressantes, enquanto a noite seus níveis caem para concentrações bastante reduzidas.

Figura 6 - Esquema da modulação circadiana dos níveis de cortisol e do ACTH modulados pelo eixo HPA ao longo de 24 horas, indicando um pico de concentração maior de cortisol e um pico inversamente menor entre 7 e 9 horas da manhã.



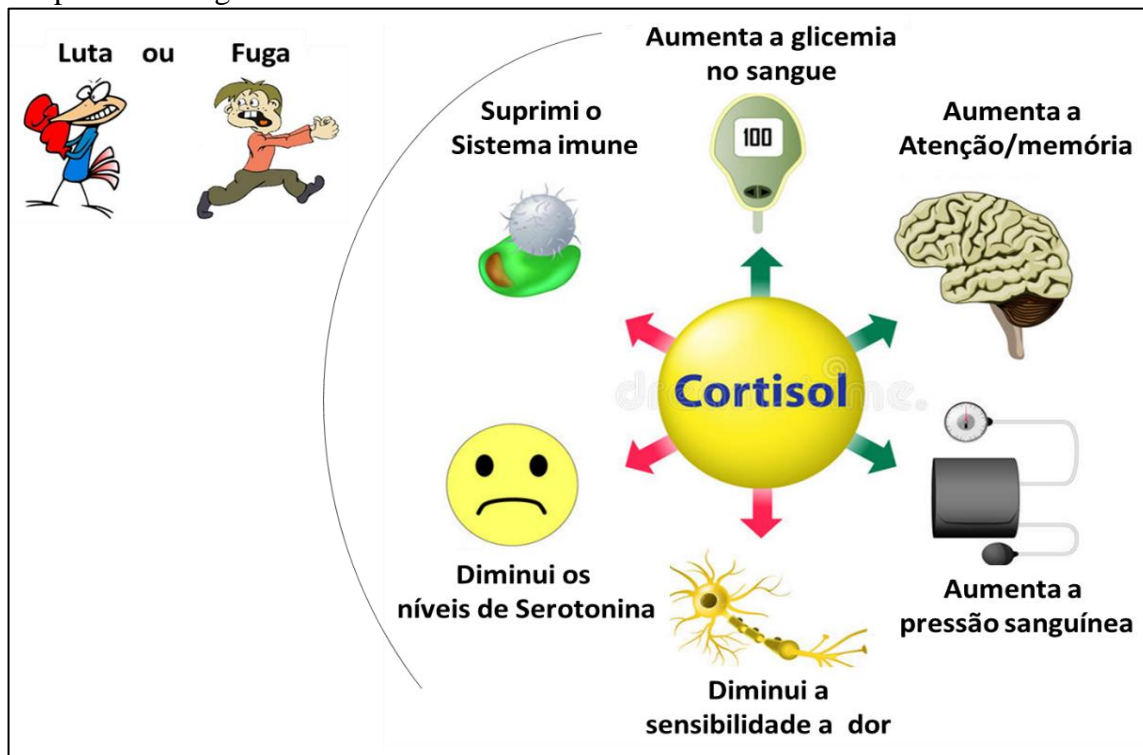
Fonte: Adaptado Boron e Boulpaep, 2016.

2.5 EFEITO DO CORTISOL NO METABOLISMO CORPORAL

Por ser uma molécula pequena e lipofílica, o cortisol também consegue se diluir rapidamente para o interior das diferentes células corporais atuando nas mesmas. Esta alta eficiência em penetrar para o interior das células é importante a fim de que o organismo se prepare para “lutar ou fugir” quando exposto a um determinado agente estressor. No caso, o cortisol possui múltiplos efeitos corporais (Figura 7), entre os quais os mais relevantes dizem respeito a: (1) indução do aumento dos níveis plasmáticos de glicose que garantem energia para o indivíduo “fugir ou lutar” quando exposto a um agente estressor; (2) aumento nos níveis de pressão arterial; (3) diminuição dos níveis de serotonina; (4) diminuição a sensibilidade a dor;

(5) aumento dos níveis de atenção e memória e (6) imunossupressão (GODOY et al., 2018; FOKEN et al., 2018).

Figura 7 – Principais alterações metabólicas desencadeadas pela liberação do cortisol em resposta a um agente estressor.



Fonte: Esquema montado pelo autor, utilizando imagens livres obtidas na internet

2.6 NEUROANATOMIA DA RESPOSTA AO ESTRESSE CRÔNICO PSICOSSOCIAL

No estresse crônico de origem psicossocial ocorre liberação de cortisol de um modo continuado o que tem profundo impacto na homeostase e saúde corporal. Ou seja, ocorre ruptura da modulação circadiana do cortisol que é esperada em situações cotidianas. A resposta ao estresse crônico envolve diferentes áreas e circuitos do SNC. Na verdade, tanto o estresse causado por agentes físicos quanto os causados por agentes psicológicos envolvem diferentes redes neurais e atividade celular. Por exemplo, distúrbios que modificam o estado fisiológico, como é o caso de infecções ou hemorragias são considerados como estressores físicos. Em animais, de acordo como a adaptação evolutiva ao seu habitat, o estresse crônico pode ser desencadeado por alterações na temperatura, umidade, luminosidade etc. Em contrapartida, estressores psicossociais são aqueles definidos como estímulos ameaçadores aversivos que podem ser antecipados, como foi citado anteriormente. Na pré-história, o estresse psicossocial

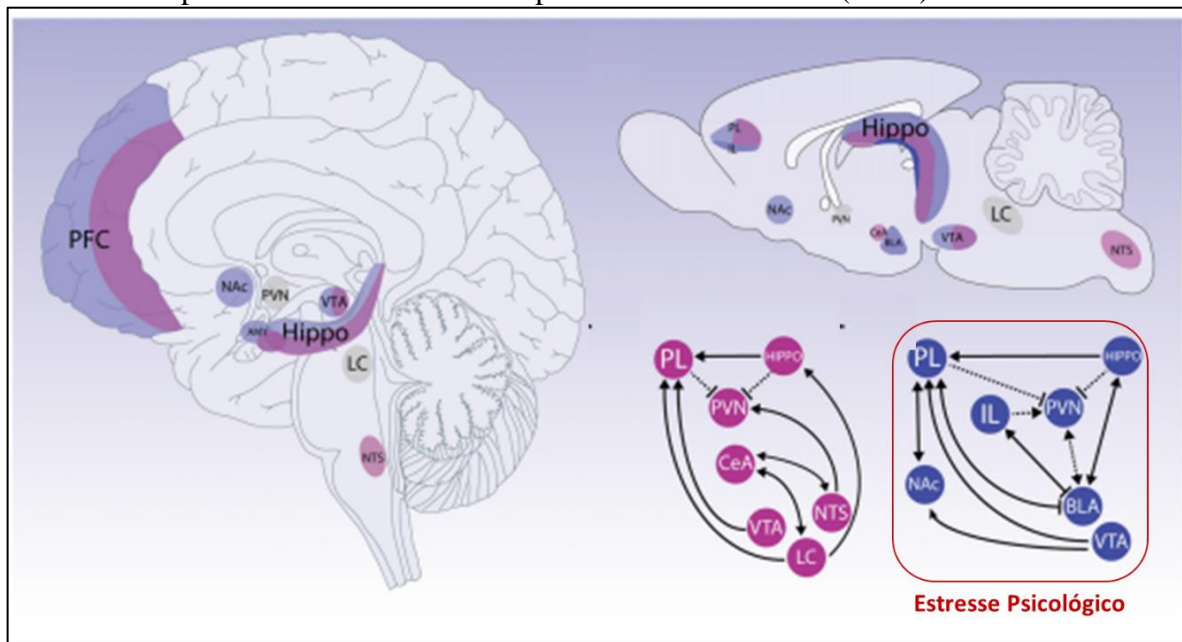
poderia envolver, por exemplo o medo de ser atacado por predador ou animal peçonhento (DAYAS et al., 2001).

Entretanto, o aumento da longevidade vivenciado pelos seres humanos, provavelmente contribuiu para o aparecimento de outros tipos de agentes estressores psicossociais relacionados ao medo de envelhecer, de adoecer, de perder entes queridos também envelhecidos (pais, companheiros conjugais e amigos), de perder a autonomia entre outros. Estes medos provavelmente ficam submergidos e são representados pela ocorrência de uma maior reatividade negativa aos “EVPE” nos idosos (SCHILLING E DIEHL, 2015).

Na revisão escrita por Schilling e Diehl (2015) sobre este tema, os autores comentaram que duas premissas antagônicas têm sido consideradas a este respeito. Inicialmente, se postulou que o envelhecimento biológico deveria estar associado a um aumento da reatividade afetiva. Neste caso a suposição seria o aumento na vulnerabilidade em termos de reatividade fisiológica durante a vida adulta e que se tornaria cada vez maior na velhice. Todavia, uma segunda possibilidade que foi levantada pelos autores é a de que, em consequência ao desenvolvimento contínuo de habilidades de auto regulação emocional, em muitos casos poderia ocorrer uma diminuição na reatividade ao estresse com a idade. Neste sentido, o envelhecimento acabaria levando a uma maior resiliência dos indivíduos ao estresse. A realidade é que até o presente momento, os resultados sobre o impacto da idade na reatividade negativa a estressores diários ainda são inconsistentes. Verdade é que existem idosos muito resilientes ao envelhecimento e outros que são altamente sensíveis em termos de reatividade emocional a estressores diários e outros estressores psicológicos.

Estudos neuroanatômicos observaram que as redes neurais que respondem ao estresse físico e ao estresse psicossocial são diferenciadas dentro do cérebro. Ou seja, os estressores psicológicos são processados por diferentes circuitos, ainda que alguns deles possam apresentar algum nível de sobreposição. Os estressores físicos são principalmente processados em nível de tronco cerebral e regiões hipotalâmicas, requerem uma resposta sistêmica imediata similar a um reflexo, envolvendo então o sistema simpático adreno-medular, seguido da fase que envolve diretamente o eixo HPA. Por outro lado, o estresse psicossocial envolve outras áreas e circuitos cerebrais (Figura 8) com destaque aos dos núcleos prosencefálicos, alguns componentes dos circuitos límbicos, como o córtex pré-frontal, o núcleo paraventricular do hipotálamo, amígdala, hipocampo, área tegumentar ventral e núcleo *accumbens* (GODOY et al., 2018).

Figura 8 - Principais estruturas e circuitos do sistema nervoso central associados a resposta ao estresse físico (em rosa) e psicológico (em azul). O estresse psicológico envolve principalmente áreas do córtex pré-frontal (PFC), a área tegmental ventral (VTA) o núcleo accumbens (NAc), regiões pré-límbicas (PL) e infra-límbicas (IL), o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo basolateral (BLA) da amígdala. No caso, o PVN (HIPPO) e o locus coeruleus (LC) representam os principais transmissores da resposta desencadeada pelo estresse psicológico desencadeado pelo eixo HPA e o eixo simpático-adrenal medular (SAM).



Fonte: Adaptado de Godoy et al. 2018

2.7 IMPACTO DO ESTRESSE CRÔNICO DE ORIGEM PSICOSSOCIAL NA FISIOLOGIA E HOMEOSTASE CORPORAL

Uma vez que o cortisol possui efeito pleiotrópico no organismo, a sua liberação frequente ou continuada em consequência ao estresse crônico de origem psicossocial tem um profundo impacto no metabolismo corporal. A exposição inicial ao estresse crônico pode aumentar o risco de infecções bacterianas e virais oportunistas associadas ao efeito imunossupressor do cortisol. Entretanto, este não é o principal efeito que o estresse crônico de origem psicossocial terá (STOVER, 2016).

2.7.1 Impacto do estresse psicossocial crônico, nos metabolismos de carboidratos, lipídios e oxidativo

Uma das principais ações do cortisol é a que ocorre no metabolismo energético dos carboidratos. Isto porque, geralmente em uma situação de estresse agudo o corpo precisará de

energia “ou para fugir ou para lutar”. A liberação do cortisol ativa mecanismos catabólicos que levam a um aumento nos níveis de glicose no sangue, o que ajuda a preparar o indivíduo para responder rapidamente ao agente estressor (KLOET et al., 2005; McEWEN E BOWLES, 2015).

Em nível tecidual o cortisol atua da seguinte forma: nos músculos, mantém a função deste tecido ainda que diminua a massa muscular proporcional do corpo; diminui a produção e aumenta a degradação óssea; em geral, diminui a quantidade de tecido conjuntivo; nos rins aumenta a filtração glomerular e a depuração da água; no sistema circulatório o cortisol mantém o débito cardíaco, aumenta o tônus das arteríolas, diminui a permeabilidade endotelial (MCPHEE E GANONG, 2007). Como o cortisol age no metabolismo glicêmico, é esperado que a exposição ao estresse crônico represente um risco para o desenvolvimento do DM2, que é uma morbidade altamente prevalente nos idosos (EINARSON et al., 2018). Entretanto, existe controvérsia sobre o papel do estresse, e da depressão e na fisiopatologia do diabetes *mellitus* tipo 2 DM 2. Revisão conduzida por Joseph e Golden (2017) sobre o tema, destaca a existência de controvérsia sobre o papel do estresse na fisiopatologia do DM2. Segundo estes autores, existem resultados diferenciados, incluindo relatos de associações positivas e negativas, dependendo do sexo, duração do acompanhamento, método de averiguação e instrumento de mensuração do estresse.

Considerando investigações longitudinais relacionadas com o tema, duas investigações encontraram associação entre alterações dos níveis de cortisol e DM2 somente em mulheres (HERACLIDES et al., 2009; GRAGNOLI 2012). Um estudo prospectivo de 35 anos de seguimento mostrou também associação positiva entre estresse crônico e DM2 em homens (NOVAK et al., 2013). Um estudo longitudinal conduzido no Reino Unido por Hackett e colaboradores (2016) que incluiu 3270 sujeitos de ambos os sexos com idade média de 61 anos, descreveu alterações nos níveis matinais de cortisol preditoras de alterações glicêmicas futuras, que poderiam levar ao DM2. Em conjunto, os resultados indicaram que, algum nível de impacto a alteração do cortisol relacionada ao estresse crônico possui na fisiopatologia da DM2, apesar da ocorrência de variações entre estudos. É importante então salientar que níveis matinais alterados de cortisol podem ser preditores de estados ou de risco de DCNTs.

Em relação ao metabolismo lipídico, o cortisol induz a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo aumentando a quantidade plasmática destas moléculas, o que propicia o estabelecimento de estados de hipercolesterolemia. O cortisol também é capaz de aumentar a utilização de energia a partir da catalise dos ácidos graxos (MCPHEE E GANONG, 2007; LEMIEUX E ABSI, 2016).

No metabolismo oxidativo a exposição continuada ao estresse psicossocial também é de grande relevância. A produção energética que leva a síntese de adenosina trifosfato (ATP) é realizada pelas mitocôndrias através de ciclos bioquímicos envolvendo a utilização de oxigênio e glicose. Entretanto, cerca de 5% do oxigênio que ingressa no interior da mitocôndria e participa da fosforilação oxidativa acaba perdendo elétrons na última camada formando assim o ânion superóxido. Esta é uma EROs, que pode reagir com macromoléculas celulares, em especial o DNA (Ácido desoxirribonucleico), lipídios e proteínas causando danos importantes e alterações cito funcionais (PANEL et al., 2018). Por este motivo, o descontrole na taxa de produção e catalise de EROs é conhecido como “estresse oxidativo”.

Em células jovens e saudáveis o controle dos níveis de EROs é feito por um sistema antioxidante enzimático e um sistema antioxidante não-enzimático. No envelhecimento biológico, a eficiência na produção de ATP pelas mitocôndrias pode diminuir desencadeando um estado de “disfunção mitocondrial”, que acaba produzindo maiores níveis do ânion superóxido. Por outro lado, a ação antioxidante destes dois sistemas pode também diminuir ao longo do envelhecimento, o que também contribui para o aumento nos níveis das EROs. Estes fenômenos são geradores de estresse oxidativo (PANEL et al., 2018).

Quando a pessoa é cronicamente estressada existe necessidade de maior produção de energia, o que aumenta a proporção de EROs. Entretanto, o aumento nos níveis de EROs necessariamente não induz elevação nos níveis de enzimas antioxidantes ou de ingresso de moléculas antioxidantes para o interior da célula. É possível que, por este motivo, o estresse crônico de origem psicossocial está relacionado a estados de estresse e dano oxidativo (ASCHBACHER et al., 2013).

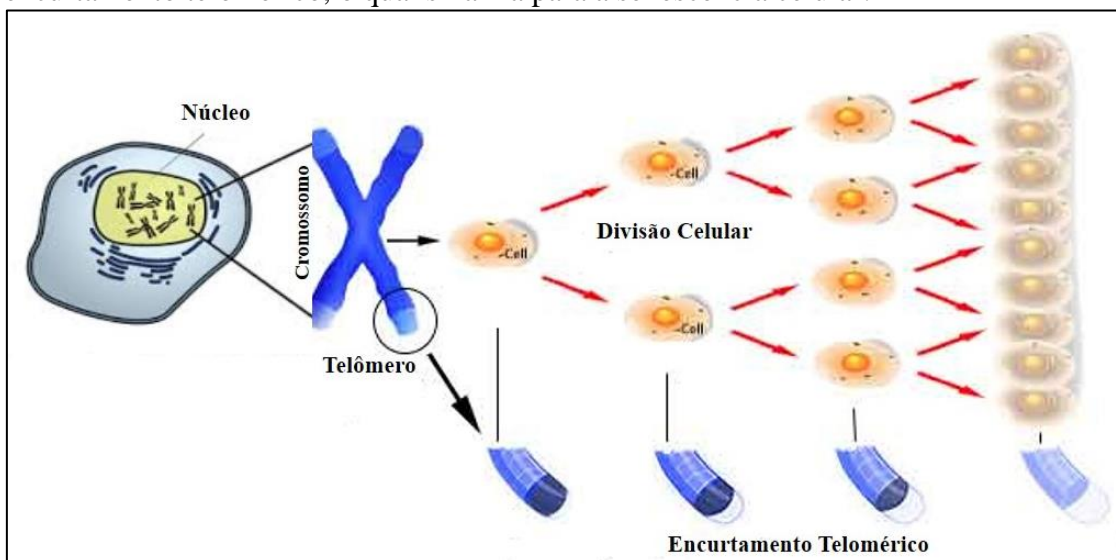
Kumar e Chanana (2017) revisaram estudos envolvendo o papel estresse crônico, em especial na modulação do óxido nítrico. Os autores destacaram que estímulos estressores ativariam a enzima óxido nítrico sintetase (eNOS) aumentando os níveis de óxido nítrico no organismo, o que poderia contribuir para a geração de estados de estresse oxidativo. Salim (2016) também destacou o estresse psicossocial persistente frequentemente perturba o bem-estar emocional via aumento do estresse oxidativo, que por sua vez estimula e retroalimenta estados de inflamação estéril. Ou seja, uma das consequências mais importantes da indução do estresse oxidativo pelo estresse psicossocial crônico seria o estabelecimento de estados de inflamação crônica de baixo grau. Esta associação será posteriormente comentada em maior profundidade.

2.7.2 Estresse psicossocial crônico e o envelhecimento celular

O envelhecimento biológico é caracterizado por um acúmulo de modificações em cascata que implica em alterações de moléculas e rotas bioquímicas, celulares e teciduais. Estas alterações acabam levando a modificações morfofuncionais características de pessoas idosas. Em nível celular, o envelhecimento geralmente diminui a taxa de reparo de mutações que estão continuamente ocorrendo no material genético (DNA) das células, também diminui a produção de transcritos e a síntese proteica. Ainda no núcleo, em muitos tipos de células o envelhecimento está diretamente associado a um fenômeno conhecido como encurtamento telomérico que induz as células a interromperem a sua proliferação. Este fenômeno também é conhecido como “senescência replicativa” (VON KOBBE, 2018).

Investigações sugerem que o estresse crônico de origem psicossocial poderia ser um fator acelerador do envelhecimento biológico, uma vez que está associado com algumas alterações que geralmente ocorrem ao longo da idade. Este é o caso da senescência replicativa associada ao encurtamento telomérico. Aqui vale lembrar que telômeros, são estruturas presentes na extremidade dos cromossomos sendo chaves na manutenção da estabilidade genômica na manutenção do estado proliferativo das células (Figura 9). O nome “telômero” deriva de uma palavra grega que significa “parte final”. Em termos químicos os telômeros são formados por uma fita simples de DNA, ao contrário do resto dos cromossomos que é formado por um DNA dupla-fita. Nos seres humanos, os telômeros são formados pela repetição da sequência –TTAGGG- essa sequência não é replicada. A cada divisão celular, mitose, ocorre a perda de uma parte desse Telômero. Este fenômeno é conhecido como encurtamento telomérico. Após cerca de 50 divisões o telômero fica muito curto e criticamente próximo da região dupla-fita de DNA onde estão contidos os genes. Esta condição sinaliza para a interrupção da divisão celular, processo conhecido como “senescência replicativa”. Por este motivo, o telômero é considerado o “relógio biológico das células” (SHALEV et al. 2013).

Figura 9: Encurtamento telomérico. No núcleo das células encontram-se os cromossomos, nas extremidades destes os telômeros, que tem como função principal a proteção do material genético. A cada divisão celular parte do Telômero é perdida, num processo denominado encurtamento telomérico, o qual sinaliza para a senescência celular.



Fonte: Esquema montado pelo autor, utilizando imagens livres obtidas na internet

Estudos têm sugerido que o estresse crônico principalmente associado a transtornos psiquiátricos, em especial a depressão, está associado a um maior encurtamento telomérico sugerindo que estas condições aceleram o envelhecimento biológico (GALLETLY et al. 2017; PUNDER et al., 2019). Um dos impactos do encurtamento telomérico na saúde envolve o próprio sistema imune, contribuindo para o estabelecimento de um fenômeno conhecido como “imunossenescência”, em que a taxa de proliferação dos linfócitos envolvidos com a resposta imune adquirida acaba sendo prejudicada, enquanto ocorre um aumento de sensibilidade a antígenos que desencadeiam processos inflamatórios (PUNDER et al., 2019).

2.7.3 Estresse psicossocial crônico e autofagia

Uma vez que a célula é uma entidade biológica ativa, ela está continuamente produzindo resíduos metabólicos indesejáveis que são catalisados pelos lisossomos incluindo resíduos de moléculas, principalmente proteínas, organelas danificadas, microrganismos patogênicos e complexos proteicos sinalizadores de inflamação (LAPAQUETTE et al., 2015). Os lisossomos, degradam este material indesejável através de um processo conhecido como autofagia. Na realidade existem diversos tipos de autofagia sendo uma das mais importantes a chamada macroautofagia. Este processo sequestra estruturas citoplasmáticas danificadas através do seu engolfamento formando uma vesícula chamada autofagossoma. Depois de formados, os autofagossomas transitam ao longo de microtúbulos e se fundem aos lisossomos. A fusão do

autofagossoma com o lisossomo forma agora uma estrutura conhecida como autolisossomas. Então enzimas hidrolases presentes no interior dos lisossomos digerem o conteúdo que estava dentro do autofagossoma (LAPAQUETTE et al., 2015).

Investigações têm descrito que o envelhecimento biológico diminui a eficiência da autofagia e que defeitos ou alterações nos processos de autofagia desempenham um papel central em uma variedade de doenças, incluindo câncer, morbidades metabólicas e doenças neurodegenerativas (RAVANAN et al., 2017). Assim, a inibição da autofagia pode ter diversas consequências negativas ao organismo do qual podem ser salientadas:

-Acúmulo de resíduos que tornam as células disfuncionais. Por exemplo, defeitos na autofagia têm sido associados com o início da patogênese da doença de Alzheimer, uma vez que nesta morbidade ocorre a formação e acúmulo de placas contendo fragmentos agrupados da proteína beta-amiloide que podem bloquear a sinalização sináptica entre os neurônios e ativar a resposta imune (ZARE-SHAHABADI et al., 2015). Os novos neurofibrilares formados por proteínas tau hiperfosforiladas que são encontrados dentro dos neurônios de pacientes com Alzheimer também representam defeitos de digestão destas moléculas (FUJIKAKE et al., 2018). Estudos focando transtornos psiquiátricos associados ao estresse crônico, como o distúrbio bipolar também descreveram que em pacientes portadores desta doença a autofagia está diminuída (OSTIGUY et al., 2009; PIERONE et al., 2020).

-Defeitos no processo de autofagia podem ser gerados ou gerar estados de estresse oxidativo que tornam a célula disfuncional, aumentam a suscetibilidade a genotoxicidade e a probabilidade de indução de apoptose. Esta condição acaba aumentando o acúmulo de resíduos metabólicos que, por sua vez podem desencadear processos inflamatórios crônicos (PANEL et al., 2018);

- A associação entre baixa eficiência da autofagia e inflamação ocorre via o acúmulo de resíduos células que passam a ser conhecidos como DAMPs (do inglês, *Damage-associated molecular pattern*). Estes padrões moleculares atuam como se fossem patógenos sendo capazes de ativar o sistema imunológico. Como as DAMPs são produzidas de modo contínuo, eles acabam gerando estados de inflamação crônica de baixo-grau que tem sido associada ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas não-transmissíveis como é o caso do DM2 e as doenças cardiovasculares. Entretanto, no cérebro também podem ser induzidos estados neuroinflamatórios crônicos, por conta deste processo de envelhecimento (MULLER et al., 2019). Apesar de ser um tema ainda explorado de modo incipiente, já existem alguns estudos sugerindo que o estresse crônico é capaz de atuar sobre os processos autofágicos. Um destes estudos foi conduzido em camundongos e mostrou que o estresse psicológico foi capaz de

diminuir a eficiência da autofagia via acúmulo de autofagossomos nas células cardíacas destes animais (LU et al, 2017).

2.7.4 Estresse psicossocial crônico, estresse oxidativo e inflamação crônica de baixo grau

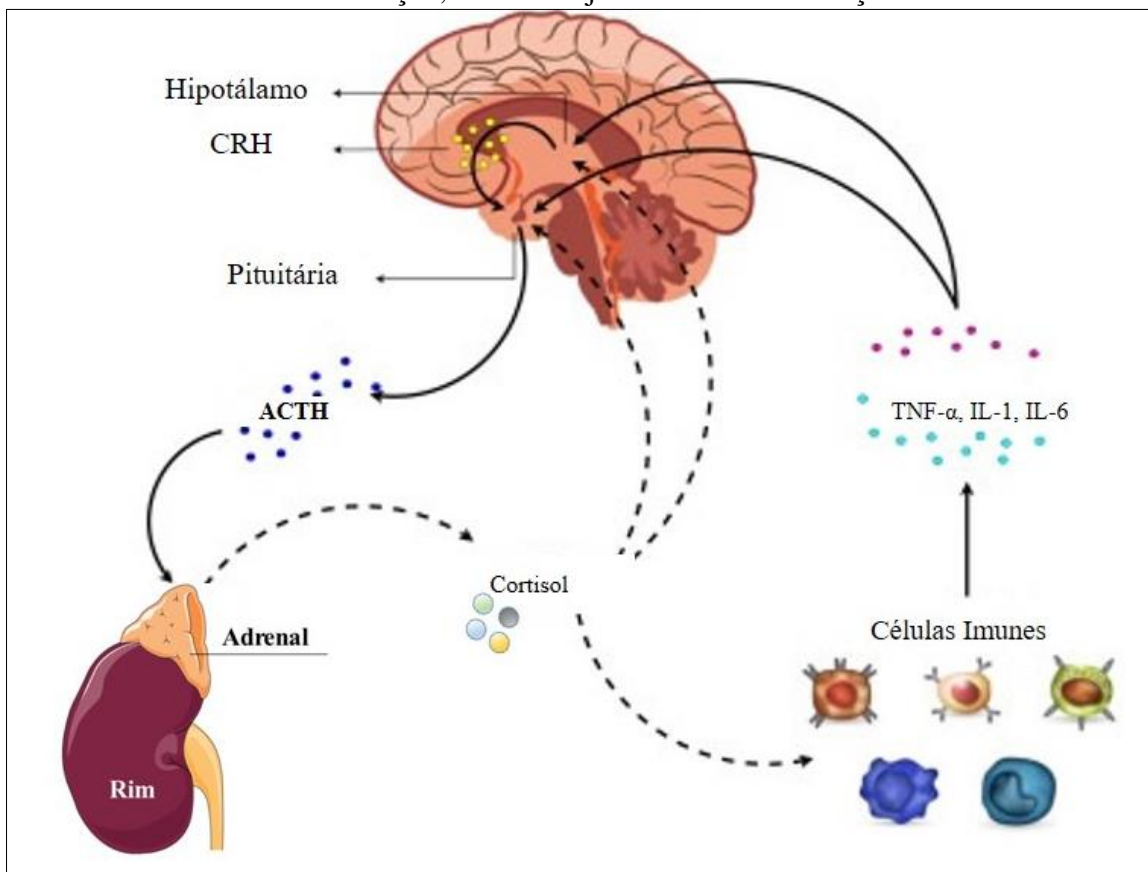
Em condições fisiológicas saudáveis, como comentado anteriormente, o cortisol tem um efeito relevante no sistema imune, já que este hormônio funciona como uma molécula imunossupressora diminuindo a resposta inflamatória e também alterando a resposta imunológica adquirida. No caso, o cortisol reduz a contagem de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos circulantes, e inibe a produção da citocina interleucina 2 (IL-2) pelos linfócitos T. Portanto, considera-se que o cortisol possua um efeito geral anti-inflamatório. Esta condição seria evolutivamente adaptativa, já que muitas situações de estresse envolviam lesões físicas teciduais que precisam ser cicatrizadas ou regeneradas o mais rapidamente possível (McEWEN & MORRISON, 2013).

Todavia, a exposição continuada ao cortisol gerada pelo estresse crônico pode causar um efeito sobre o sistema imune que é prejudicial ao organismo. Isto porque, o cortisol também interfere diretamente no processamento de antígenos, na produção de anticorpos e na depuração dos mesmos. Deste modo, uma forma sintética do cortisol, denominada hidrocortisona tem sido produzida e é utilizada como um fármaco anti-inflamatório (DAMJANOVIC E HANLEY, 2007; GOUIN et al., 2008; McEWEN & MORRISON, 2013).

Aqui é importante recordar alguns dos principais aspectos relacionados a resposta inflamatória do organismo. Na presença de microrganismos ou de uma lesão física, a inflamação vai acontecer principalmente pela ativação de macrófagos residentes no tecido infectado ou lesado. Estas células entram em um estado conhecido como “macrófagos M1” passando a liberar para o meio extracelular citocinas pró-inflamatórias, em especial a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês, *Tumor necrosis factor alpha*). Os macrófagos também aumentam sua taxa de proliferação nesta fase, e a taxa de fagocitose dos microrganismos ou tecido necrosado. Além disto, as citocinas inflamatórias servem como sinalizadoras para que outros tipos de leucócitos presentes no sangue sejam atraídos e migrem para o tecido injuriado, em especial neutrófilos. Por ser uma resposta intensa, na medida em que os agentes desencadeantes da inflamação vão sendo controlados os macrófagos M1 se transformam em macrófagos M2 e passam a produzir agora citocinas anti-inflamatórias, em especial a IL-10. Estes macrófagos também inibem a primeira a produção de maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias e induzem a regeneração

tecidual. Portanto, na fase M1 os macrófagos apresentam um comportamento destrutivo e fagocitário, enquanto na fase M2 os macrófagos apresentam um comportamento regenerativo. Quando, este processo é interrompido e os macrófagos permanecem na fase M1 ocorre a chamada “inflamação crônica de baixo grau”. Apesar do cortisol ser, a princípio uma molécula anti-inflamatória, na medida que ela passa a ser produzida em níveis elevados em decorrência de estados de estresse psicossociais crônicos, esta propriedade acaba sendo alterada e esta molécula passa a apresentar agora efeito pró-inflamatório (Figura 10) (FRIES et al., 2014).

Figura 10- Relação eixo HPA cortisol e células imunes. 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

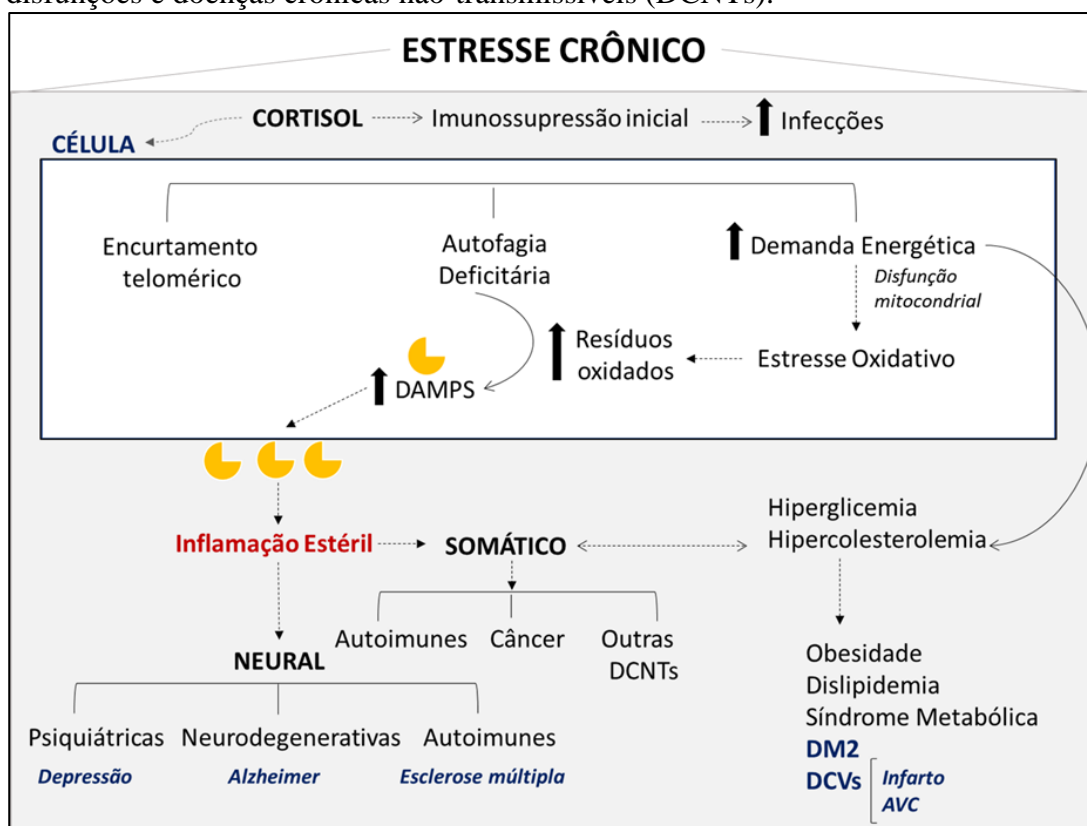


Fonte: Adaptada de Fries et al., 2014.

Ou seja, o estresse psicoemocional leva a estados de estresse oxidativo, que por sua vez induzem estados de inflamação crônica de baixo grau também conhecida como inflamação estéril (Figura 11). A sequência das alterações bioquímicas e fisiológicas envolvidas com este processo é: (1) estresse psicossocial crônico; (2) induz aumento na produção de ATP, que aumenta proporcionalmente a produção do ânion superóxido; (3) não ocorre retroalimentação positiva na produção de enzimas antioxidantes, aumentando assim os níveis de superóxido e outras EROs; (4) as EROs reagem com macromoléculas em especial promovendo lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e danos no DNA, que aumentam os resíduos metabólicos das células. Novamente aqui, não ocorre aumento na taxa de autofagia e parte destes resíduos acaba migrando e se depositando na matriz extracelular dos tecidos. Estes resíduos indesejáveis são conhecidos como DAMPs, que acabam ativando os macrófagos e

desencadeando assim uma resposta inflamatória; (5) como a produção de DAMPs é continuada, o estado inflamatório estabelecido não é finalizado estabelecendo-se assim a inflamação crônica de baixo grau; (6) a inflamação crônica de baixo grau contribui diretamente para a disfunção tecidual e o estabelecimento de diversos DCNTs. No cérebro promove a neuroinflamação associada com transtornos psiquiátricos como a depressão maior (DAMIANOVIC et al., 2007, GOUIN ET al., 2008, PEERI E AMIRI, 2015; GREEN et al., 2021).

Figura 11- Síntese dos principais eventos celulares, fisiológicos e patológicos associados a exposição ao estresse crônico de origem psicossocial que induz estresse oxidativo, produção de DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), inflamação crônica de baixo grau, disfunções e doenças crônicas não-transmissíveis (DCNTs).



Fonte: Esquema montado pelo autor

Em seres humanos, acredita-se que a resiliência, ou seja a “resistência ao estresse psicossocial” frente à adversidade seja promovida por uma combinação de genótipos resistentes ao estresse, temperamento e comportamento de enfrentamento que poderiam promover maior longevidade celular (EPEL E LITHGOW, 2014). Entretanto, além das correlações sugestivas, não se sabe se a resistência psicológica ao estresse, frequentemente descrita como “resiliência”, está associada à resistência a múltiplos estressores no nível celular ou se os termos são meramente relacionados conceitualmente, mas não mecanicamente.

2.8 POTENCIAL ASSOCIAÇÃO ENTRE RESILIÊNCIA AO ESTRESSE PSICO-COMPORTAMENTAL E O DESBALANÇO OXIDATIVO SUPERÓXIDO-PEROXIDO DE HIDROGÊNIO (S-PH)

Como foi anteriormente comentado, investigações sobre o mecanismo causal o estresse psicossocial sobre a saúde, longevidade e desenvolvimento de doenças psiquiátricas sugerem que o mesmo está associado a altos níveis de estresse oxidativo (DANDEKAR et al., 2015; SIES 2015; LUCA et al., 2020). Assim, são contundentes as evidências que associam o estresse oxidativo ao envelhecimento biológico e a mais de 200 tipos de doenças e disfunções crônico-degenerativas (LIGUORI et al., 2018; FRANCESCHI et al., 2018). Entre estas se incluem o diabetes *mellitus* 1 e 2, obesidade, hipercolesterolemia, aterosclerose, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, músculo-esqueléticas e o câncer. O estresse psicoemocional e transtornos psiquiátricos também parecem afetar o metabolismo oxidativo e inflamatório levando a estados de estresse oxidativo e inflamação crônica. Para melhor compreensão desta associação é importante destacar alguns aspectos do metabolismo oxidativo e inflamatório (LIGUORI et al., 2018; FRANCESCHI et al., 2018).

Espécies aeróbias, incluindo seres humanos produzem constantemente determinadas EROs, como subprodutos da produção de energia pelas mitocôndrias. Cerca de 5% do oxigênio que migra para o interior da mitocôndria se transforma em ânion superóxido (que passará a ser identificado neste trabalho como ânion S) ao longo da fosforilação oxidativa. Para controlar os níveis destas moléculas, evitando situações de estresse oxidativo, o organismo possui um sistema enzimático antioxidante bastante eficiente. Os níveis do ânion S são controladas pela enzima antioxidante superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2 ou MnSOD) que dismuta o ânion S em peróxido de hidrogênio (que passará a ser identificado neste trabalho pela abreviatura HP). Esta molécula, por sua vez é catalisada em água e oxigênio pela ação da enzima glutathione peroxidase (GPX) (BRESCIANI et al., 2013; 2015).

Entretanto, ao contrário do que se pensava há 50 anos, EROs e espécies intermediárias de nitrogênio (EINs) não têm somente efeitos negativos no organismo, já que em baixos níveis e em condições altamente reguladas muitas destas moléculas são importantes sinalizadores celulares como é o caso do óxido nítrico e do H₂O₂. Para algumas células, inclusive o ânion superóxido, uma EROs altamente reativa, possui relevância biológica, este é o caso de macrófagos e de células polimorfonucleares que o utilizam na resposta imunológica inata, em especial na atividade fagocitária (BLASER et al., 2016).

Com base nestas evidências, atualmente não se considera EROs como um grupo homogêneo de moléculas que causam estresse oxidativo uniforme apresentando função deletéria ao organismo. Existem EROs que funcionam como moléculas sinalizadoras de grande importância para a função celular e fisiológica do organismo, com destaque ao próprio ânion superóxido e ao peróxido de hidrogênio (JAKUBCZYK et al., 2020). Neste contexto, também existem evidências de que o desbalanço S-HP pode estar relacionado a disfunções orgânicas e ao risco de diversas DCNTs.

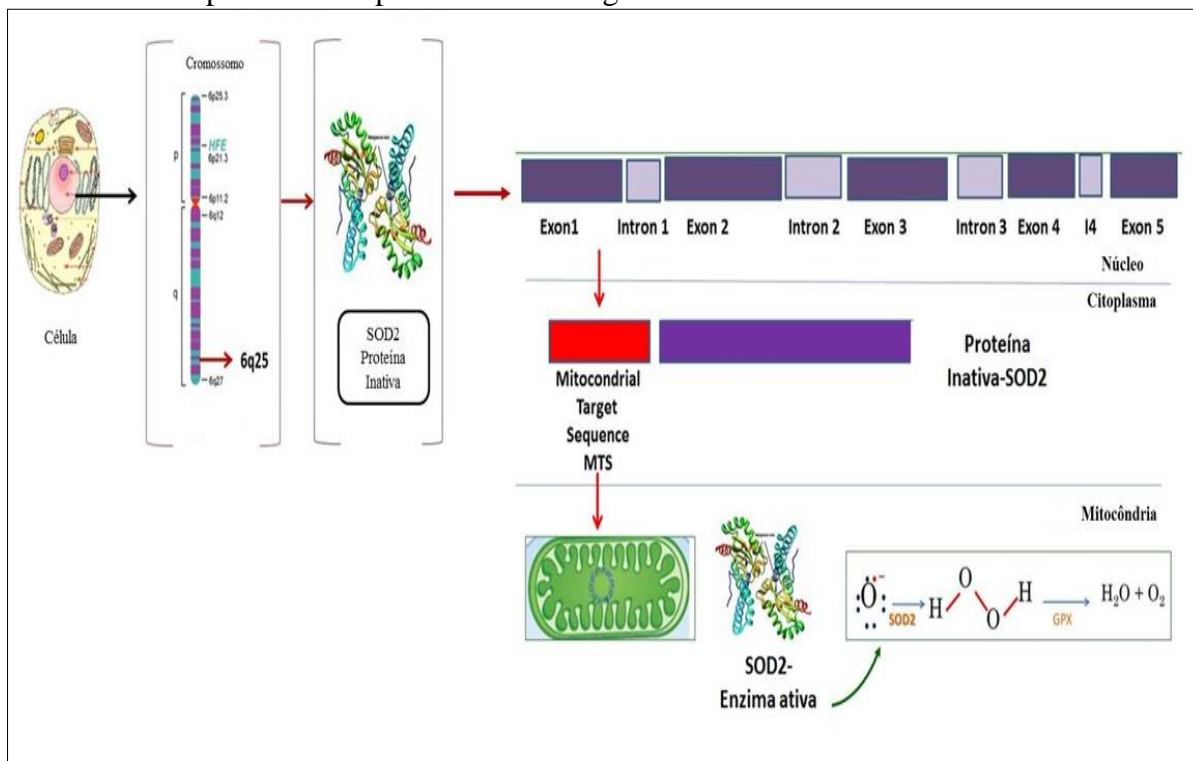
Esta questão tem sido estudada a partir de análises epidemiológicas e também *in vitro* do polimorfismo valina dezesseis alanina da superóxido dismutase dois (Val16Ala-SOD2) localizado no gene da enzima superóxido dismutase dependente de manganês que atua na dismutação do ânion $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 no interior da mitocôndria (BRESCIANI et al., 2013). Esta organela é a que mais produz superóxido via vazamento de elétrons durante as reações mitocondriais, em especial a cadeia fosforilativa, relacionada a produção do ATP a partir de glicose e oxigênio. Neste processo, cerca de 5% do oxigênio perde elétrons na última camada e se transforma no $O_2^{\bullet-}$ que é uma EROs. As enzimas da família da superóxido dismutase (SOD), catalisa 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).

2.8.1 O Polimorfismo Genético Val16Ala-SOD2

Dentre as SODs, a SOD2 é a enzima superóxido dismutase mais relevante por atuar no interior da mitocôndria, na qual ocorre a maior produção de EROs. 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 (MTS- do inglês, *Mitochondrial Target Sequence*). 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 da proteína SOD2 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.



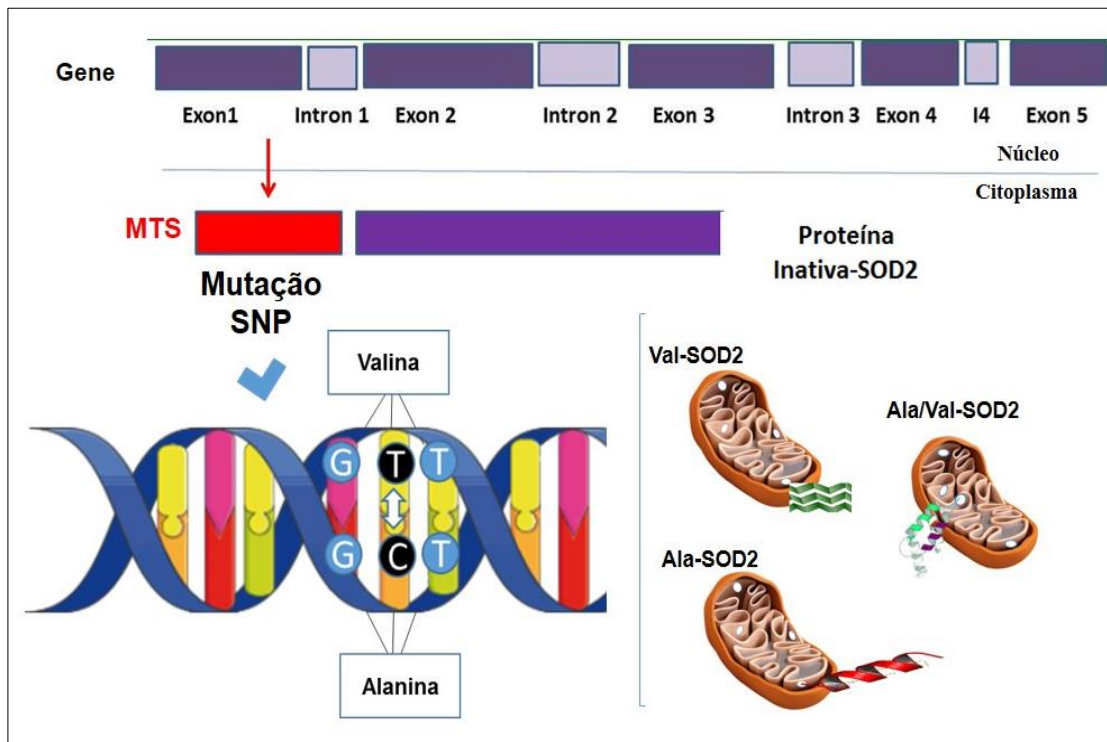
Fonte: Barbisan et al., 2017

Existe um polimorfismo por mutação pontual (SNP, do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) encontrado no gene da SOD2 que envolve a troca de um único nucleotídeo, levando 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 que cada indivíduo pode ser portador de acordo com a sua herança genética. Em termos fenotípicos, a variante Ala-SOD2 possui uma estrutura α -hélice, sendo assim facilmente importada para o interior da mitocôndria. Já a variante Val-SOD2 possui uma estrutura parcial de β -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 α -hélice, a Val-SOD2 possui uma estrutura parcial de β -lâmina, e a variante Ala/Val-SOD2 apresenta estrutura helicoidal.



Fonte: Barbisan et al., 2017

A presença da alanina faz com que a proteína SOD2 possua uma forma alfa-hélice permitindo a entrada fácil da mesma para o interior da mitocôndria. Estima-se que o genótipo AA produza uma enzima 40% mais eficiente que o genótipo homocigótico VV (BRESCIANI et al., 2013, 2015).

Ao contrário do que se possa pensar, a maior eficiência da enzima relacionada ao genótipo AA não é benéfica a célula e ao organismo. Isto porque, o aumento nos níveis de HP não é acompanhado pelo aumento da GPX. Como o H_2O_2 é mais solúvel em membranas, o excesso desta EROs extravasa para o citoplasma, onde reage com íons metais como o cobre e zinco (reação de Fenton) produzindo hidroxila ($OH\cdot$). Ao contrário do $O_2\cdot^-$ e do H_2O_2 , a $OH\cdot$ não possui enzimas específicas que a catalisem, e por também ser uma molécula altamente reativa o aumento nos seus níveis pode causar danos extensivos a célula, em especial ao DNA.

Tendo o radical OH- alta afinidade com o DNA causando quebras e mutações (BARBISAN et al., 2017).

Estudos epidemiológicos têm descrito associação entre o genótipo AA 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).

Todavia, alguns resultados obtidos são controversos, provavelmente porque a modulação do balanço S-PH é influenciada por fatores externos como a dieta. Um estudo feito por Ambrosone et al., (1999) mostrou que mulheres portadoras do genótipo AA possuíam quatro vezes mais chance de desenvolver câncer de mama que as demais. Entretanto, este risco caía a zero nas mulheres portadoras do genótipo AA que apresentavam alto consumo habitual de frutas e verduras. Os estudos epidemiológicos conduzidos por pesquisadores do Laboratório de Biogenômica descreveram associação entre o genótipo AA com câncer de mama em homens e mulheres e também câncer de próstata (BICA et al., 2009, 2010). Também foi observado que o genótipo AA está mais associado a marcadores de imunosenescência (TAUFER et al., 2005).

Por outro lado, o genótipo VV por possuir uma enzima SOD2 menos eficiente está associado a níveis basais mais elevados do ânion superóxido. Uma vez que virtualmente todas as células sintetizam óxido nítrico, e que existe uma grande afinidade entre o superóxido e o óxido nítrico, a reação entre estas duas moléculas produz uma espécie ativa de nitrogênio o peroxinitrito. Este reage com lipídios presentes nas membranas das organelas e membrana plasmática em um processo conhecido como lipoperoxidação, causando danos extensivos as células (COSTA et al., 2018)

Provavelmente por este motivo, o genótipo VV tem sido associado ao risco de doenças cardiometabólicas. Por exemplo, nos estudos conduzidos pelo Laboratório de Biogenômica da UFSM foi descrita uma associação inicial entre o genótipo VV e níveis elevados de LDL-oxidado, principalmente em idosos diabéticos do tipo 2 (GOTLIEB et al., 2005). Adicionalmente, foi descrita associação com obesidade (MONTANO et al., 2009), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010), e níveis elevados de marcadores inflamatórios (MONTANO et al., 2012). Um estudo complementar realizado em parceria com a Universidade de Leon também mostrou que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 influenciava na modulação da expressão genica, proteína e enzima da SOD2 em adultos jovens submetidos a exercício exaustivo (BRESCIANI et al., 2013). Com base nestes resultados foi postulado que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderia ter algum efeito farmacogenético em indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com rosuvastatina (20 mg). Os resultados publicados mostraram

que portadores do genótipo VV apresentavam uma resposta menos eficiente ao fármaco, principalmente considerando a modulação de citocinas inflamatórias (DUARTE et al., 2016).

A partir destes resultados para melhor investigar o impacto do desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio na célula, um modelo experimental foi criado onde células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) obtidas de indivíduos previamente genotipados para o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e cultivadas *in vitro*. O primeiro estudo avaliou se este polimorfismo influenciava na toxicidade celular causada pela exposição de raios ultravioletas. Os resultados mostraram que CMSP-AA apresentavam níveis mais elevados de genotoxicidade enquanto CMSP-VV de lipoperoxidação (MONTAGNER et al., 2010). Estudos complementares mostraram que, o desbalanço bidirecional S-HP tinha influência negativa de acordo com o tipo de exposição ambiental ou farmacológica (COSTA et al., 2012; ALGARVE et al., 2013; BARBISAN et al., 2014; DORNELLES et al., 2017).

Entretanto, como os resultados obtidos a partir do modelo experimental genético poderiam ser influenciados por outros genes ou fatores ambientais relacionados aos voluntários doadores das CMSPs, um segundo modelo experimental foi concebido. Neste modelo, foi utilizada a suplementação *in vitro* de paraquat (metilviologênio) que produz níveis elevados de superóxido e a porfirina que é uma molécula similar a enzima SOD2 por produzir níveis elevados de H₂O₂. Os dois primeiros estudos realizados com este modelo avaliaram o efeito do desbalanço na biologia de linhagem comercial de câncer de próstata e linhagem comercial de câncer colorretal. No caso, células de câncer de próstata mostraram suscetibilidade aumentada ao H₂O₂ enquanto células de câncer colorretal ao superóxido (BERTO et al., 2015). Por outro lado, as células de câncer colorretal foram mais suscetíveis ao AS (AZZOLIN et al., 2016).

Um outro estudo *in vitro* descreveu o efeito do desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio farmacologicamente induzido na ativação de macrófagos RAW. Os resultados demonstraram que células VV-like apresentaram maior expressão da enzima pró-inflamatória Glicogênio sintase quinase três beta (GSK-3β). Quando as culturas foram tratadas com o lítio, que é uma molécula utilizada na psiquiatria como modulador de humor e possui ação anti-inflamatória o efeito foi mais atenuado em macrófagos VV-like que os AA-like (BARBISAN et al., 2018). Um outro estudo recente conduzido por Jobim et al., (2019) sugeriu que o fenótipo VV-like produzido pela exposição a concentrações baixas de Paraquat em queratinócitos (HaCAT) diminuiu a viabilidade destas células, aumentou as taxas de lipoperoxidação, dano de DNA e apoptose.

Infelizmente, estudos envolvendo SNP Val16Ala-SOD2, e transtornos psiquiátricos ainda são bastante incipientes. Na presente revisão de literatura conduzida aqui foram

identificadas apenas quatro investigações prévias que analisaram potencial associação entre este polimorfismo e transtornos de humor (depressão) que são altamente associados ao estresse crônico. Dois destes estudos sugeriram influência do Val16Ala-SOD2 em condições depressivas, enquanto outros dois estudos que não encontraram associação entre esse SNP e depressão (PAE et al., 2006; CURMURCU et al., 2013). Ambas as investigações positivas relataram associação entre maior frequência de genótipos VV e depressão em mulheres (GAŁECKI et al., 2010); e com gravidade da depressão em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (PIETRAS et al., 2010).

No entanto, um estudo mais recente realizado por Wigner e colaboradores (2018) descreveu associação significativa entre depressão em pacientes adultos e desequilíbrio oxidativo geneticamente causado por polimorfismo nas enzimas antioxidantes SOD2, catalase (CAT) e GPX. Os autores comentaram que os resultados corroboram a hipótese de que o estresse oxidativo e nitrosativo poderia estar envolvido na patogênese dos transtornos depressivos. Também não foram identificados trabalhos prévios envolvendo potencial associação entre autopercepção de estresse psicossocial crônico e o polimorfismo Val16Ala-SOD2.

Porém, considerando o conjunto de informações aqui abordadas, é possível que o desbalanço S-HP esteja associado a maior risco de autopercepção de estresse psicoemocional e depressão principalmente nos idosos.

Uma vez que existem estudos sugerindo influência do polimorfismo Val16Ala-SOD2 em marcadores oxidativos e inflamatórios do sangue, também é possível inferir que, indivíduos saudáveis portadores dos genótipos homozigóticos poderiam apresentar algum tipo de alteração nos níveis matinais de cortisol, ACTH, DHEA e BDNF. Como portadores saudáveis do genótipo VV-SOD2 apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (MONTANO et al., 2009; DUARTE et al., 2016; BARBISAN et al., 2017) é possível que variações no eixo HPA, mesmo dentro da faixa da normalidade esperada poderia indicar uma potencial maior “responsividade fisiológica a exposição ao estresse psicossocial”.

2.9 MINHOCA CALIFORNIANA COMO MODELO *IN VIVO* DO DESBALANÇO FARMACOLÓGICO SUPEROXIDO-PEROXIDO DE HIDROGÊNIO NA MODULAÇÃO OXI-INFLAMATÓRIA E DA RESPOSTA AO ESTRESSE

As evidências prévias que sugeriram associação entre os genótipos homozigóticos do polimorfismo Val16Ala-SOD2 com DCNTs e (BERTO et al., 2015; AZZOLIN et al., 2016) forneceram a base para o potencial estabelecimento de um modelo experimental animal submetido a desbalanço farmacológico superóxido-peróxido de hidrogênio. Ao longo da revisão da literatura, e para evitar a utilização de modelos complexos como roedores, por questões econômicas, éticas e logísticas a minhoca californiana foi identificada como um potencial modelo experimental. Por ser de fácil manipulação e de baixo custo econômico para a sua manutenção, estudos com minhocas californianas foram implantados no Laboratório de Biogenômica em 2019, local onde foi conduzida parte das análises feitas nesta investigação.

2.9.1 Bioecologia das minhocas

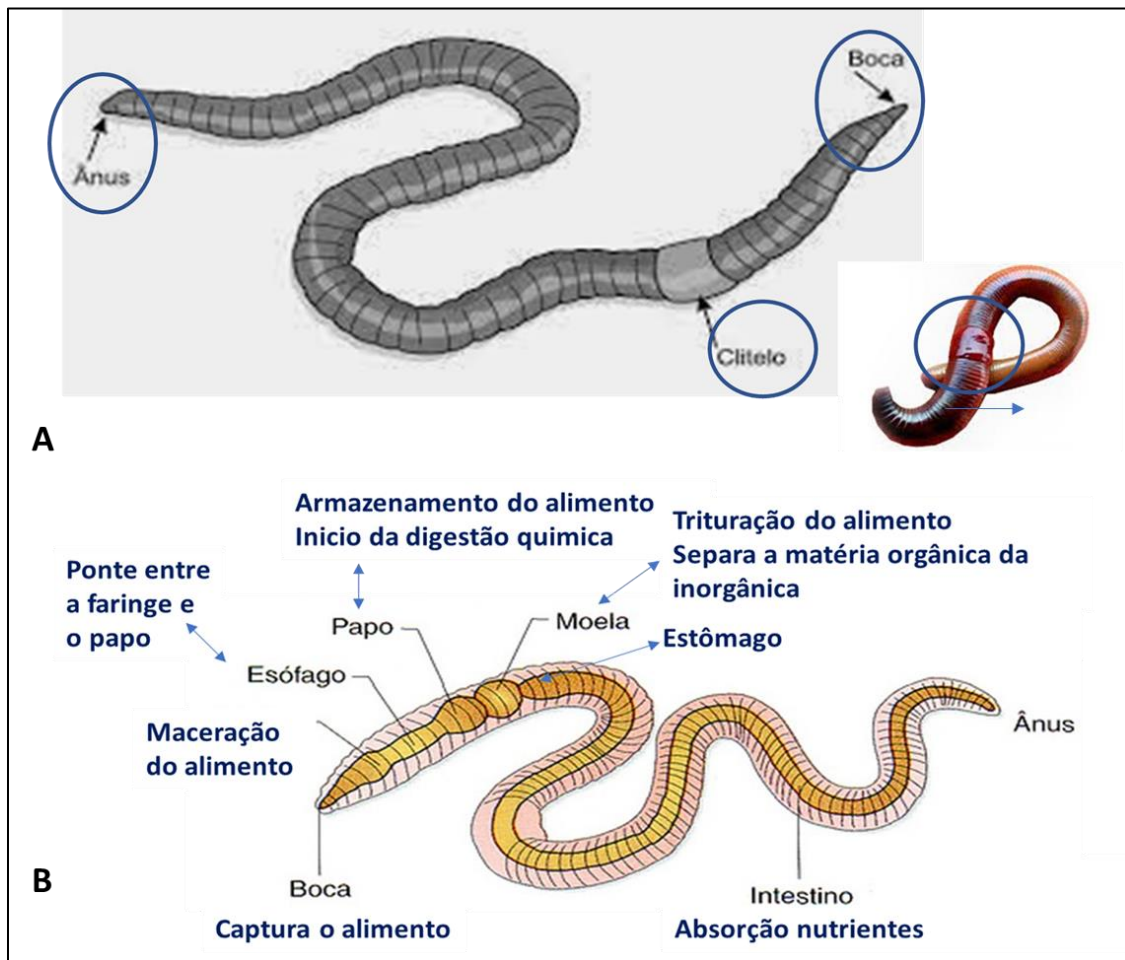
Com a perspectiva de estabelecer a minhoca vermelha californiana (*Eisenia fetida*) como modelo farmacológico do desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio, se faz necessário destacar os principais aspectos da biologia geral e comportamental deste organismo. Minhocas compõe espécies pertencentes ao filo de invertebrados Anelídea da classe Oligoqueta que significa “poucas cerdas”. Minhocas são espécies que têm capacidade de locomoção e de escavação do solo que representa o seu principal habitat. Em geral são animais detritívoros, ou seja, se alimentam de resíduos vegetais e animais que estão presentes na terra oriundos e que entraram em decomposição. A propriedade escavatória da minhoca e a constante deglutição e excreção de terra formam o húmus. Este composto é conhecido por regenerar a terra, tornando-a muito apropriada para as mais diversas culturas agrícolas. O húmus também serve para recuperar solos degradados, já que recicla nutrientes. Em termos comportamentais a minhoca possui adaptações que tornam possível a sua fuga de ambientes poluídos e também regenerativas, o que permite que parte do animal seja predada e o mesmo não morra (BLOUIN et al., 2013).

Como minhocas são animais ectotérmicos, não conseguindo gerar calor a temperatura ambiental é de grande relevância para a sua sobrevivência ficando entre 10 a 21° C para a maior parte das espécies. Quando o clima está quente podem permanecer um pouco mais próximo a superfície para absorver calor, mas quando está muito frio permanecem enterradas profundamente no solo para evitarem morrer congeladas.

Em termos embriológicos minhocas são animais com simetria bilateral, protostômios (o blastóporo origina a boca), celomados e triploblásticos (desenvolvem-se a partir de três camadas embrionárias distintas, a ectoderme, mesoderme e endoderme). Os anelídeos são o primeiro grupo de animais celomados, ou seja, possuem uma cavidade interna que é preenchida por fluído celômico e revestida por tecido de origem mesodérmica que secreta tal fluido. No caso do ser humano dá origem a cavidade abdominal e torácica. Na cavidade celômica da minhoca também se encontra o tubo intestinal e outras estruturas corporais, como os nefrídios que funcionam de modo similar aos rins. Uma síntese dos principais sistemas corporais da minhoca é apresentada na Tabela 1.

A principal característica sistemática das minhocas é a presença de segmentação corporal (metâmeros) que pode ser observada na sua anatomia externa (Figura 14). O número de segmentos é variável conforme a espécie e varia de 7 a 500 e 600 segmentos. Considera-se que a metamerização confere uma vantagem adaptativa adicional ao animal já que permite a especialização de segmentos ou grupos de segmentos para diferentes funções. Entretanto, esta característica não é muito desenvolvida nos anélidos em comparação com outros animais, como os artrópodos. Na minhoca, a boca localizada em posição ventral está situada no 1º segmento que também é chamado segmento bucal. Neste mesmo segmento existe na parte dorsal uma protuberância denominada prostômio que tem função tátil. Por outro lado, minhocas não possuem olhos, nariz e orelhas. Na outra extremidade encontra-se o ânus, e em indivíduos adultos se observa uma estrutura abaulada denominada clitelo.

Figura 14- Morfologia externa das minhocas (A) e principais órgãos do sistema gastrointestinal e suas funções. A minhoca fica constantemente deglutindo terra, do qual vai retirando nutrientes para a sua sobrevivência. A terra eliminada (defecada) produz o húmus.



Fonte: Esquema montado pelo autor, utilizando imagens livres obtidas na internet

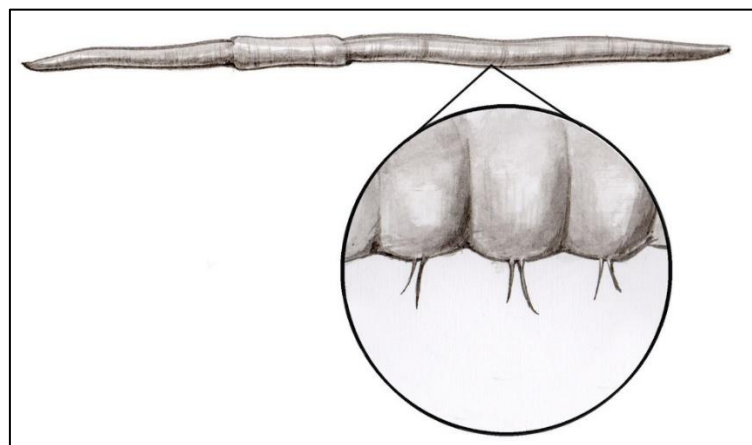
O clitelo é uma glândula localizada ao redor do corpo da minhoca sendo composto por diversos segmentos e tipos de células. Estas secretam um muco especial que é responsável por manter os animais alinhados durante a cópula, lembrando que a minhoca é hermafrodita e esta união existe para permitir a troca de espermatozoides entre dois indivíduos da espécie (BLOUIN et al., 2013).

Na região anterior, próximo da cavidade bucal encontramos o cérebro da minhoca que é do tipo ganglionar e que está vinculado a outros gânglios presentes em outros segmentos corporais e a um cordão ventral nervoso que se estende por todo o corpo. A boca se une a faringe que desemboca no esôfago, estômago, moela e papo. Ao redor do esôfago se observa uma estrutura vascular reconhecida como 5 corações ligados a dois grandes vasos (dorsal e ventral) que se ramificam em capilares espalhados por todo o corpo da minhoca. Na região subjacente ao estômago são reconhecidas as estruturas sexuais masculinas incluindo testículos

e vesículas seminais. Próximo também se encontra o ovário. Perto do papo a próstata e o clitelo são identificados. Nos demais segmentos além dos intestinos, serão observadas estruturas que atuam como rins e outras estruturas vasculares e nervosas que fornecem autonomia a cada segmento. Esta repetição de estruturas é de fundamental importância no processo de regeneração do corpo da minhoca (ZHENG et al., 2016).

As cerdas possuem um papel importante na locomoção porque, fixam o animal na terra quando o músculo está relaxado no momento da locomoção. Cada metâmero da minhoca apresenta um par de cerdas. A presença e quantidade de cerdas é uma característica utilizada para a classificação sistemática dos anelídeos. No caso das minhocas, estas pertencem a classe dos oligoquetas que significa animal de poucas cerdas (Figura 15). Aqui é importante comentar que as cerdas se formam de células localizadas abaixo da camada muscular longitudinal. Na sua base existem um músculo protátil e um músculo retrator que permite a fixação destas estruturas no solo no segmento que está relaxado e a liberação destas estruturas do solo, quando o segmento está contraído (RUIZ E OR, 2018).

Figura 15- Detalhe das cerdas presentes em cada metâmero (segmento) do animal. Cerdas são localizadas ventralmente e auxiliam na fixação ao substrato e locomoção da minhoca que é direcionada por contrações dos músculos circulares e longitudinais da parede corporal.



Fonte: Esquema montado pelo autor, utilizando imagens livres obtidas na internet

Tabela 1 Síntese das principais características dos principais sistemas corporais do anelídeo *Eisenia fétida* (minhoca californiana) relevantes para o presente estudo.

Sistemas corporais	Principais características
Tegumentar	Corpo da minhoca é recoberto por uma camada epidérmica (epitelial colunar) que secreta uma cutícula de quitina que reveste a parte externa do animal. A quitina apresenta poros por onde se projetam as cerdas e também que permitem trocas gasosas. A camada epidérmica também possui células mucosas que facilita a aderência ao meio e a sua locomoção. Não possuem derme (fibroblastos). A camada epitelial liga-se diretamente a camada muscular esquelética do corpo do animal (Figura 16)
Respiratório	Não possui sistema respiratório organizado. A respiração é cutânea e o muco tem função relevante neste processo garantindo a umidade necessária para as trocas gasosas. Respiração ocorre por gradiente de difusão, onde o oxigênio se difunde até os vasos sanguíneos. Por ter uma respiração cutânea minhocas são muito sensíveis a umidade, temperatura e pH porque estas variáveis influenciam diretamente as trocas gasosas.
Circulatório	Minhocas possuem circulação fechada (100% do sangue flui dentro dos vasos sanguíneos). Possui dois vasos sanguíneos principais, um dorsal e um ventral que formam uma rede de capilares na parede celular que fazem as trocas gasosas. Os vasos se ligam um com o outro por 05 vasos contrateis transversais que funcionam como se fossem 05 corações localizados na região anterior da minhoca. O sangue da minhoca contém uma quantidade relativamente menor de células imunes. Estas se concentram principalmente na cavidade celômica do animal.
Muscular	É de fundamental importância porque permite a locomoção do organismo, escavação e organização de longas galerias que formam pequenos túneis. Também permite que as minhocas consigam perfurar camadas mais rígidas do solo. O corpo da minhoca possui duas camadas musculares ligadas entre si: músculo circular e longitudinal. O músculo circular liga-se diretamente a epiderme através de uma membrana basal acelular que é secretada pelas células epiteliais. Camada muscular longitudinal interna, que é significativamente mais espessa do que a camada muscular circular externa, consiste em feixes de células musculares separadas por septos do tecido conjuntivo radial. Durante a locomoção, enquanto alguns segmentos musculares se contraem, e portanto encurtam, outros relaxam, e portanto alongam. O líquido celomático presente no interior do animal, com as contrações e relaxamentos forma uma espécie de “esqueleto hidrostático” que pode alterar a forma corporal do animal (Figura 16).
Reprodutivo	Minhocas são animais com reprodução sexuada, mas são hermafroditas possuindo gonadas femininas e masculinas. Entretanto, geralmente ocorre troca de semen entre duas minhocas. Para facilitar a atividade sexual, um dos segmentos corporais aumenta de tamanho e produz muco utilizado para aumentar a aderência entre as duas minhocas. Este segmento

modificado denomina-se clitelo e é utilizado como marcador da maturidade reprodutiva do animal. Assim, animais clitelados são minhocas que já estão em fase reprodutiva e animais não-clitelados são as formas mais jovens da minhoca. Cada minhoca produz entre 100 a 140 descendentes.

Nervoso

Possui um sistema nervoso rudimentar. Entretanto, em termos evolutivos é neste filo que aparece uma estrutura nervosa identificada como SNC e também estruturas identificadas como SNP e SNA (Figura 17). Nestas espécies, o SNC consiste em um gânglio cerebral, subesofágico e numeroso do nervo ventral (VNC), dentre os quais os últimos os situados nos segmentos do meio do corpo (pós-clitelares) são uniformemente organizados. Existem três nervos segmentares, cada um inervando órgãos e tecidos periféricos, recebendo mais informações de intero- e exteroceptores. Entretanto, os neurônios das minhocas não chegam a ser verdadeiramente mielinizados, e por isto os diâmetros axonais são bem grandes resultando em estrutura conhecidas como “fibras gigantes”. Assim, minhocas possuem uma fibra gigante medial e duas fibras gigantes laterais. Esses feixes de nervos são responsáveis por receber informações externas, como luz, calor, umidade e vibrações.

No SNC existem corpos celulares (células sensoriais centrais), motoneurônios gigantes e somata de axônios gigantes e interneurônios) já foi descrita. A posição anatômica dos tratos interneuronais direcionados longitudinalmente e vias sensoriais centrais, os chamados feixes de axônios longitudinais sensoriais também foram identificados. As últimas estruturas compiladas a partir das projeções centrais das células sensoriais primárias estão localizadas no epitélio da parede corporal.

Imune

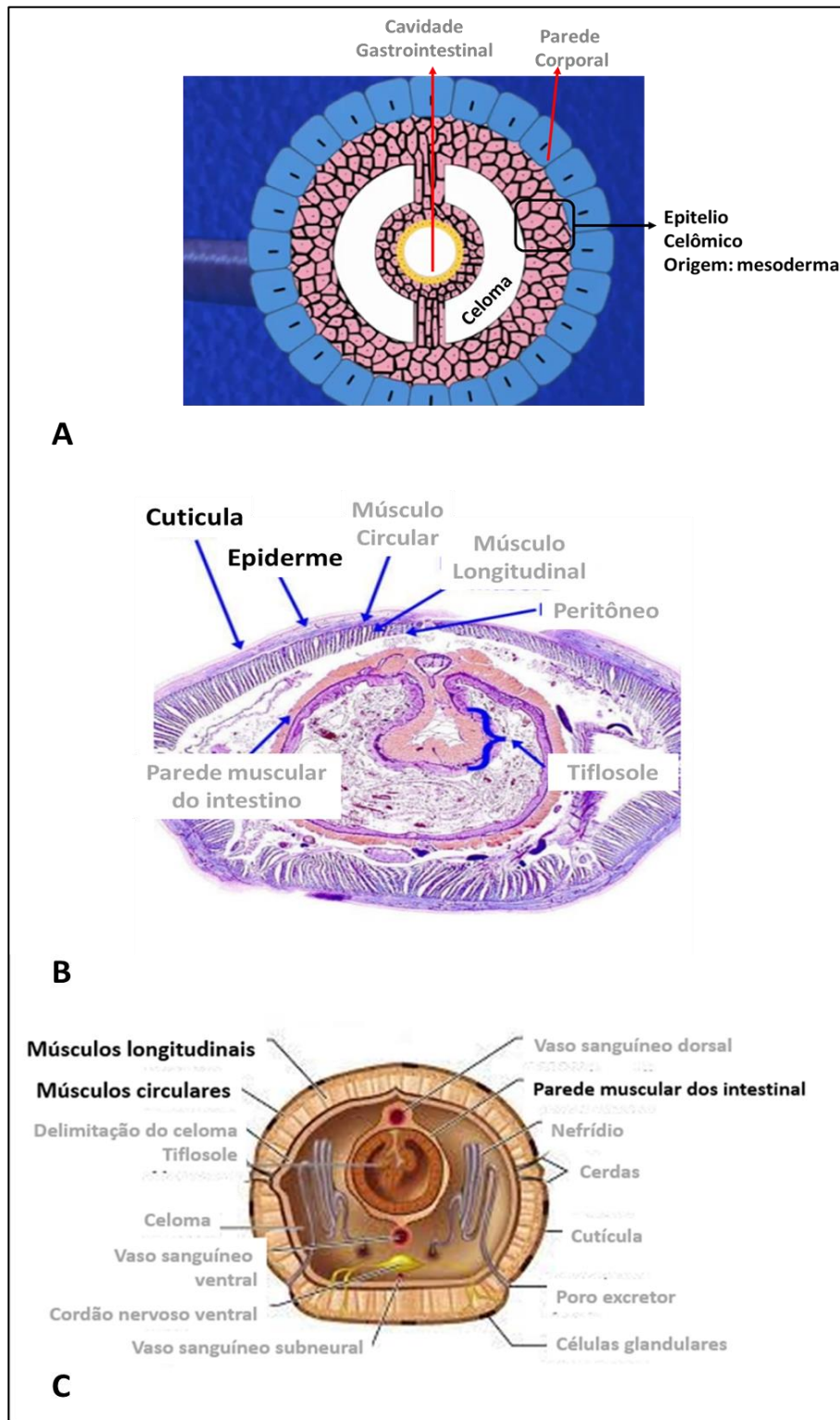
Apresentam um sistema imune bem desenvolvido existindo células imunocompetentes denominadas celomócitos localizadas na cavidade celômica do animal. O transporte do fluido celômico e dos celomócitos entre os segmentos é regulado por canais. Cada segmento da cavidade celômica é aberto ao ambiente externo por um par de nefrídios (similar a um rim primitivo) e por um poro dorsal. A primeira barreira imune não específica de minhocas é a pele que cobre todo o corpo que contém mucopolissacarídeos que atuam como barreira antimicrobiana. Como cada segmento possui um poro que se comunica com o exterior, a cavidade celômica da minhoca não é estéril e sempre contém bactérias, protozoários e fungos. No celoma encontram-se as células imunes da minhoca conhecidas como celomócitos. Alguns autores dividem os celomócitos em três populações celulares diferenciadas: amebócitos hialinos, amebócitos granulares e eleócitos também chamados de. Outros dividem estas células em cinco grupos: leucócitos tipo I (basófilos) e II (acidófilos), neutrófilos, granulócitos e eleócitos. Os microrganismos invasores podem ser eliminados de várias maneiras:

Todos os tipos de celomócitos podem reconhecer materiais estranhos, realizar fagocitose e encapsulamento. Em presença de corpos estranhos ou substâncias irritantes, a minhoca é capaz de extrudar (liberar) o líquido celômico com suas células imunes. Esta característica torna atraente o uso do sistema imune da minhoca em experimentos, porque a extrusão não causa dano aparente a minhoca, sendo as principais: (1) excreção de microrganismos através dos nefrídios que ligam ao poro dorsal; (2) fagocitose feita por alguns tipos de celomócitos, que posteriormente também são excretados pelos poros dorsais; (3) na presença de corpos estranhos maiores como agregados de bactérias, ou parasitas, estes são eliminados através de um processo chamado encapsulamento. Este

processo é comum em invertebrados. Como estas estruturas maiores não podem ser fagocitadas, elas atraem coelomócitos que começam cerca-la. Estes celomócitos também liberam DNA dupla-fita com determinadas proteínas que formam uma rede que atrai, prende e começa a destruir estes corpos grandes. Este fenômeno conhecido como NET (do inglês, *neutrophill extracellular traps*), foi descrito primeiramente em seres humanos. Na medida que as células se agregam e formam redes vai se formando uma estrutura cada vez mais esférica que começa a escurecer via produção de melanina. Quando esta cápsula possui cerca de 1-2 mm diâmetro, suas células externas perdem a aderência e fica boiando no líquido celomico. Esta estrutura é genericamente conhecida como “corpo marron”. Os corpos marrons uma vez formados começam a se acumular nos segmentos posteriores da minhoca, perto da região anal. Quando existe uma quantidade expressiva destas estruturas ocorre sinalização para a autotomia (corte dos segmentos), liberando os encapsulados e desencadeando regeneração. Como o encapsulamento é um processo dinâmico e que logo é desencadeado pela presença de corpos estranhos grandes, é possível avaliar a eficiência da resposta imune via formação e comparação dos corpos marrons formados por minhocas submetidas a um determinado tratamento.

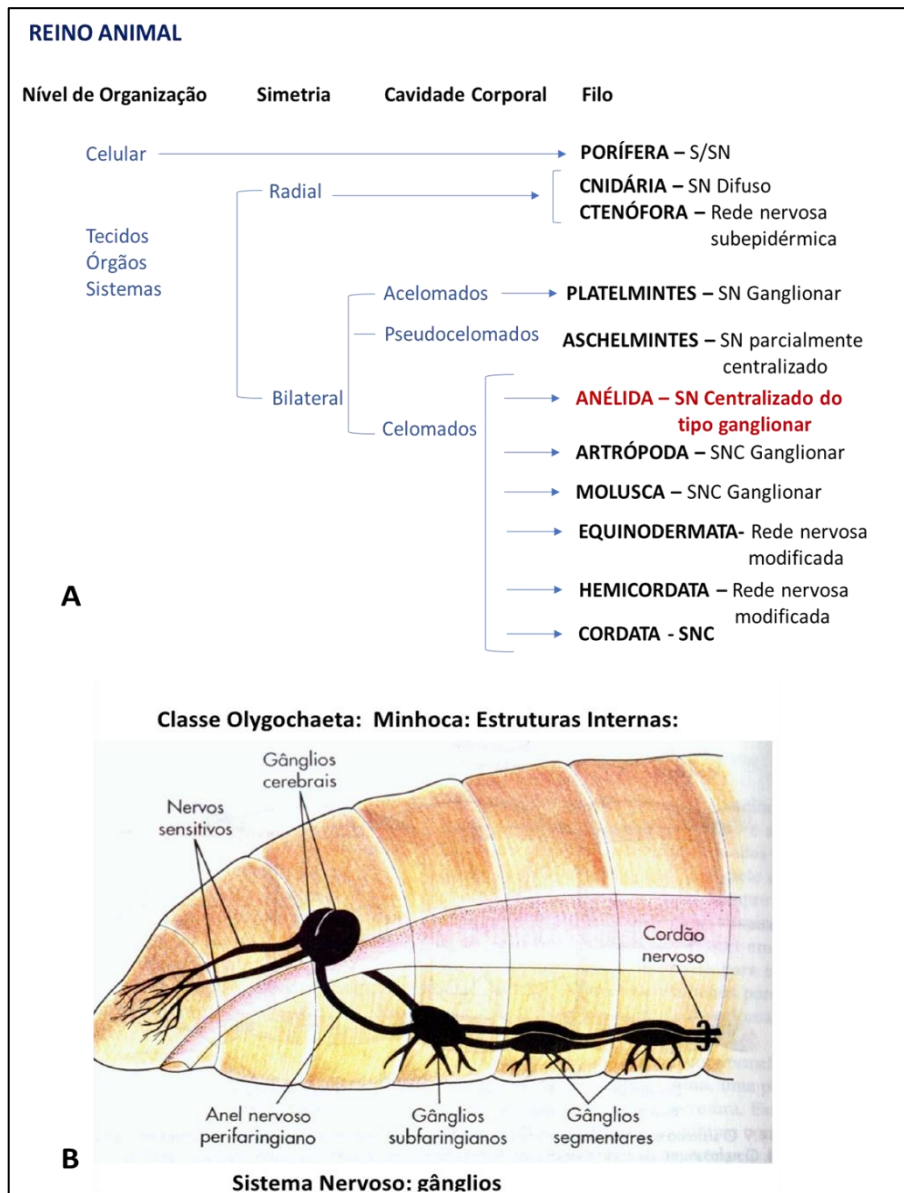
Principais fontes bibliográficas: Rushton, 1945; Hama, 1960; Rude, 1966; MacManus et al., 1982; Endo e Endo, 1988; Walker et al., 1996; Spörhase-Eichmann , 1987; Kurek e Plytycz, 2003; Calisi et al., 2016; Khan et al., 2019; Bilej et al., 2010; Blouin et al. 2013; Molnar et al., 2012; Solt et al., 2016; Shi et al., 2018; Velki e Ečimović, 2017; Valenzuela e Varacallo, 2020; Wu et al., 2019.

Figura 16-Aspectos gerais relacionados com a parede corporal da minhoca, tegumento e camada muscular.



Fonte: Adaptado e modificado de Rico et al., 2016 e Khan et al., 2012.

Figura 17-Aspectos filogenéticos relacionados a evolução do sistema nervoso nos diferentes grupos taxonômicos animais (A) e da estrutura ganglionar do sistema nervoso central das minhocas. Os anelídeos que é o grupo que pertence a minhoca californiana são os primeiros animais a apresentar sistema nervoso central do tipo ganglionar.



Fonte: O autor

2.9.1.1 Neurofisiologia geral das minhocas

As minhocas possuem um SNC anglionar, ainda que o número células neurais seja bastante reduzido: existem cerca de 302 neurônios e 7.000 sinapses. Por exemplo, a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*, outro invertebrado muito utilizado como modelo experimental de estudos genéticos e farmacológicos, possui cerca de 250.000 neurônios e 10 milhões de sinapses. Nas últimas décadas, a anatomia funcional dos gânglios das minhocas tem sido analisada, e a localização exata de alguns corpos celulares (células sensoriais centrais (CSC),

motoneurônios e axônios gigantes e interneurônios) já foi descrita. A posição anatômica dos tratos interneuronais direcionados longitudinalmente e vias sensoriais centrais (feixes de axônios longitudinais sensoriais) também já foram identificados. No caso, a rede de axônios periféricos se liga os gânglios a estruturas sensoriais presentes no tegumento da minhoca e em outros órgãos internos (RUDE, 1966; SPÖRHASE-EICHMANN et al., 1987). Entretanto, enquanto as fibras gigantes mediais respondem a estímulos da extremidade anterior, as fibras laterais respondem à estímulos originados na extremidade posterior do corpo do animal. Os dois tipos de fibras também são distinguíveis por suas velocidades de condução. No caso, as fibras laterais conduzem potenciais de ação mais lentos que as fibras mediais. Nos gânglios também são encontrados interneurônios, o que se traduz em alguma similaridade estrutural e funcional observada na medula humana. Minhocas também apresentam no seu SNC células da glia que dão sustentação aos neurônios e também secretam compostos que auxiliam na sobrevivência e nutrição neuronal (CSOKNYA et al., 2012).

A presença e abundância de células sensoriais na parede corporal das minhocas é bem conhecida. Estas células podem ser encontradas sob a forma de receptores ou estarem organizadas em grupos de células que respondem a estímulos químicos, mecânicos ou a luz. Com base na sua estrutura, estas células podem ser classificadas como células sensoriais: uniciliadas, multiciliadas penetrantes, multiciliadas não-penetrantes e ciliadas basais. Plexo nervoso e fotorreceptores do tipo fossoma também foram identificados na epiderme corporal da minhoca (CSOKNYA et al., 2012).

Estudos prévios, com destaque ao conduzido por Koza e Csoknya et al., (2004) demonstraram a relevância de diversos neuroreceptores no controle das camadas epitelial e muscular das minhocas, incluindo receptores serotoninérgicos, do ácido gama-aminobutírico (GABA), dopaminérgicos e de histamina. Células bipolares sensoriais solitárias presentes junto ao epitélio contêm receptores para os neurotransmissores: serotonina, tirosina hidroxilase, histamina e GABA. Já na parede muscular também se encontram receptores para a histamina, GABA e para o neuropeptídeo Y. Aqui é importante comentar que, em mamíferos incluindo o ser humano o neuropeptídeo Y está diretamente implicado na regulação da alimentação e apetite. Entretanto, em invertebrados parece também estar associado a comportamentos sociais

Csoknya et al., (2005) também descreveram presença de células sensoriais na parede corporal exibindo imunorreatividade para a serotonina, tirosina hidroxilase, histamina, GABA e outros. Testes farmacológicos mostraram que as contrações musculares desencadeadas pela serotonina podem ser suprimidas pela aplicação de GABA. O estudo também mostrou que a

serotonina atua tanto nos receptores presentes nas células musculares, como tem atuação indireta através da sua liberação por neurônios. No caso, o perfil farmacológico dos receptores serotoninérgicos e gabaérgicos se assemelham aos do receptor 3 da serotonina (5-HT₃) e GABA_B dos seres humanos.

Células sensoriais dopaminérgicas distribuídas na epiderme minhocas transmitem informações sensoriais ao cordão nervoso ventral, que por sua vez ativam as fibras gigantes dorsais e os motoneurônios que controlam os reflexos rápidos do animal (SPÖRHASE-EICHMANN et al. 1998). Além destas informações, Barna e colaboradores (2001) descreveram que a dopamina, octapamina (neurotransmissor encontrado apenas em invertebrados) e a serotonina atuam diretamente nas células musculares do trato alimentar.

É importante salientar que os neuro receptores serotonina e GABA formam a base da comunicação neural e possuem um papel crucial no comportamento, movimento, percepção sensorial, aprendizagem e memória (JOCELIEN et al., 2013). Por este motivo, existe formação sináptica por axônios serotoninérgicos e GABAérgicos em interneurônios. Estudos prévios têm mostrado que os mesmos também formam conexões nos neurônios das minhocas (Van KESTEREN e SPENCER, 2003).

O mensageiro neuronal gasoso, o óxido nítrico, é amplamente distribuído em vias sensoriais de ambos os vertebrados e invertebrados sugerindo a importância desta molécula na mediação de vários estímulos (externos e internos). Kitamura et. al., (2001) observaram que a serotonina induz produção de óxido nítrico por células componentes do cordão nervoso central, principalmente de neurônios localizados no lado ventral desta estrutura. Posteriormente, Solt e colaboradores (2016) descreveram a presença do óxido nítrico como um potencial neurotransmissor no sistema nervoso das minhocas e seu envolvimento na percepção de estímulos químicos e mecânicos. Além disso, esta molécula parece mediar a informação sensorial das minhocas, exibindo tem função integrativa, uma vez que está presente nos neurônios e motoneurônios do SNC.

Um estudo realizado por Ponesakki e colaboradores (2017), analisou o transcriptoma do cordão neural da *E.fetida* identificando 9762 transcritos sendo 7680 de genes com função conhecida. Um total de 22 neuropeptídeos similares a outros anelídeos foram observados sugerindo que os mesmos têm um papel importante na neurotransmissão e neuromodulação destas espécies. Além disto foram observados 108 genes homólogos aos dos seres humanos incluindo genes de regulação epigenética e do ciclo celular. Assim, o conjunto dos resultados sugere que a minhoca poderia ser um modelo experimental utilizado para estudos

comportamentais relacionados a exposição ao estresse, já que apresenta alguns elementos estruturais e neurobioquímicos similares ao dos seres humanos, ainda que muito primitivos.

Em síntese, apesar de existirem poucas informações aglutinadas sobre a neurobiologia das minhocas, o conjunto dos resultados sugere que a as mesmas possuam neurotransmissores que têm diversos papéis relevantes nas funções somáticas e comportamentais destas espécies, ainda que não estejam aglutinados em órgãos como encontrados em animais mais complexos, incluindo aqui mamíferos e seres humanos.

2.9.1.2 Resposta ao estresse comportamental em minhocas aplicado ao estudo da resiliência

Em termos evolutivos, as respostas que compõem a cascata de defesa de um dado animal são consideradas como “estados emocionais primitivos”. Por sua vez, estes são coordenados por padrões de resposta motora-autônômica-sensorial que são ativados automaticamente quando o animal é exposto a uma situação de perigo. Para os seres humanos, a ativação das respostas de defesa pode ser experimentada como avassaladora e fora do controle consciente. Na prática clínica, esses fenômenos são comuns e ocorrem em uma ampla gama de distúrbios e apresentações clínicas incluindo o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), reações peritraumáticas (como em agressões físicas ou sexuais, ou após acidentes ou desastres naturais), trauma complexo, limítrofe transtorno de personalidade e estados de intenso sofrimento, potencialmente levando a danos pessoais (KOZLOWSKA et al., 2015). É claro que a minhoca está longe de possuir comportamentos e distúrbios tão complexos como os observados em seres humanos! Entretanto, neste organismo já se encontra bem estabelecida a resposta comportamental conhecida como “resposta de luta e fuga”, do qual algumas podem ser utilizadas em estudos comparativos de responsividade comportamental ao estresse que são indicadores de resiliência.

Estudos de resiliência têm sido realizados em modelos experimentais animais. No caso, animais resilientes e suscetíveis podem ser distinguidos por seu desempenho em tarefas comportamentais específicas, apresentando menor quantidade de efeitos deletérios do estresse (STEIMER E DRISCOLL, 2005 ; KRISHNAN et al., 2007 ; FEDER et al., 2009 ; ERGANG et al., 2015). Uma modo de distinguir se a resiliência do animal está sendo afetada por determinadas alterações genético-ambientais é a comparação do comportamento dos mesmos frente a um agente estressor, com animais controles.

Apesar de ser um SNC simples, este animal pode ser potencialmente utilizado em modelos de responsividade ao estresse já que reagem a temperatura, ao toque, vibrações

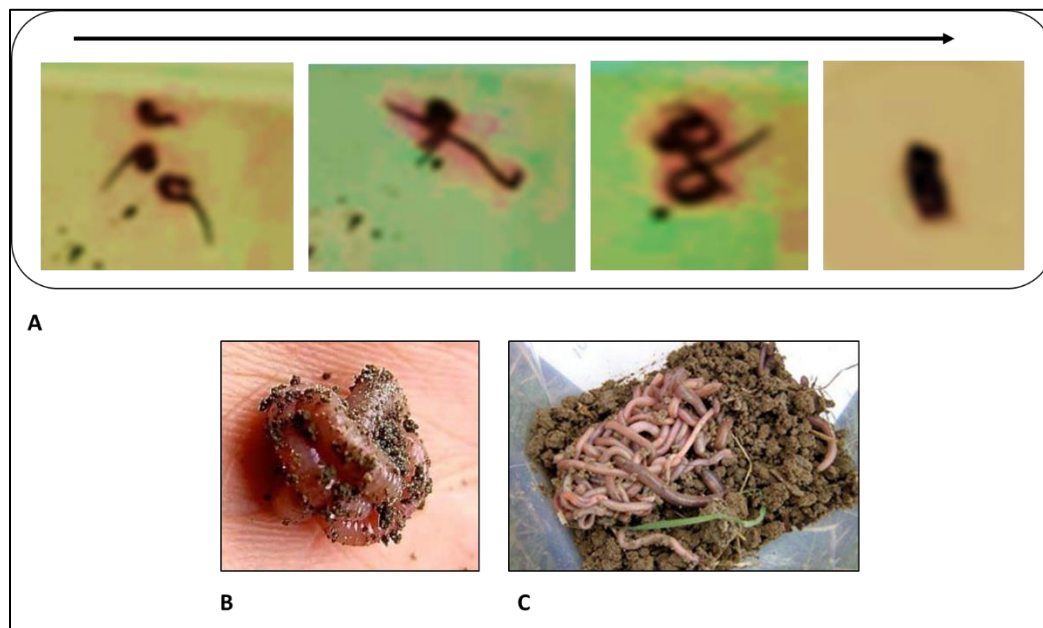
também possuindo quimiorreceptores que detectam odores e luz. Como os raios ultravioletas podem matar estes animais, minhocas tendem a se afastar de ambientes em que ocorre exposição direta a luz. Minhocas são mais ativas entre o anoitecer até o amanhecer. Investigações mostraram que minhocas utilizam menos oxigênio ao longo do dia sugerindo baixa atividade neural e que elas ficam em um estado similar ao “sono” (McMANUS E WYERS, 1982). Considerando sua estrutura anatomofuncional e seu habitat natural, a minhoca não possui mecanismos de ‘luta evidentes’ como são encontrados em animais mais complexos, incluindo invertebrados como escorpiões e aranhas (GARDNER, 1976). Por outro lado, os mecanismos de resposta defensiva ao estresse da minhoca, são bastante evoluídos quando comparados a animais evolutivamente inferiores. Estes podem incluir:

(1) comportamentos rápidos de defesa: no qual se inclui comportamento de fuga quando ocorre toque físico ou vibrações associadas a potencial presença de predadores. Estes reflexos de fuga se mantem até mesmo quando o animal está sob forte privação nutricional (VINING et al., 1982);

(2) comportamento de evitação, principalmente desencadeado pela ocorrência de fatores abióticos indesejáveis, como ambiente com temperaturas elevadas, iluminação, e também pela presença de alterações químicas no solo, incluindo aqui pH ácido e componentes tóxicos, em especial pesticidas (SYED et al., 2017);

(3) um outro comportamento muito importante para a sobrevivência da minhoca é o “enovelamento ou comportamento de estivação” (Figura 18). Como as minhocas são altamente dependentes da água, quando os solos secam as minhocas entram em um estado de “estivação”, no qual adotam a posição semelhante a um nó apertado para reduzir a quantidade de área de superfície exposta ao solo. Esta posição cria “câmaras” ligadas por muco onde a umidade permanece mais alta evitando o ressecamento. Entretanto, parece que outros tipos de estresse ambientais também poderiam induzir enovelamento nas minhocas em um comportamento considerado social (ZIRBES et al., 2013).

Figura 18- “Enovelamento” da minhoca quando as condições ambientais são negativas. (A) Sequência de de comportamento de agrupamento enovelado de três minhocas colocadas em um recipiente com água; (B) enovelamento de uma minhoca em condições de ressecamento; (C) Comportamento de agrupamento de minhocas quando em condições de ressecamento.



Fonte: (A) o autor; (B, C) Schneider, 2013.

Em relação aos mecanismos comportamentais rápidos, o reflexo de fuga (*escape reflex*) da minhoca é grande parte mediado por arco reflexos (Figura 19). O primeiro estudo sobre o tema foi publicado por Ruston em 1945, no qual o autor descreveu um reflexo de condução controlado pelas fibras nervosas gigantes da minhoca. De fato, quando uma minhoca é fisicamente tocada ela responde rapidamente ao toque via encurtamento do corpo que ocorre pela contração das fibras musculares circulares do seu corpo. Logo a seguir, uma onda peristáltica faz com que o animal se mova para longe do estímulo. Junto com o encurtamento do corpo, também é observado um reflexo de achatamento da região caudal, no qual os 20 segmentos posteriores se contraem dorso-ventralmente ao mesmo tempo que se ampliam. Este reflexo faz com que a região posterior passe a apresentar uma forma achatada (parecida com uma espátula). É possível que esta mudança no formato corporal dificulte o predador agarrar a minhoca para come-la. Ambos reflexos são acionados a partir de um estímulo tátil na cabeça, que estimula o sistema de fibra gigante mediano a uma condução nervosa rápida via o cordão nervoso ventral. Esta condução transmite potenciais de ação posterior para neurônios motores que inervam a musculatura corporal (PALLAS E DREWES, 1981, GRAS, 1984).

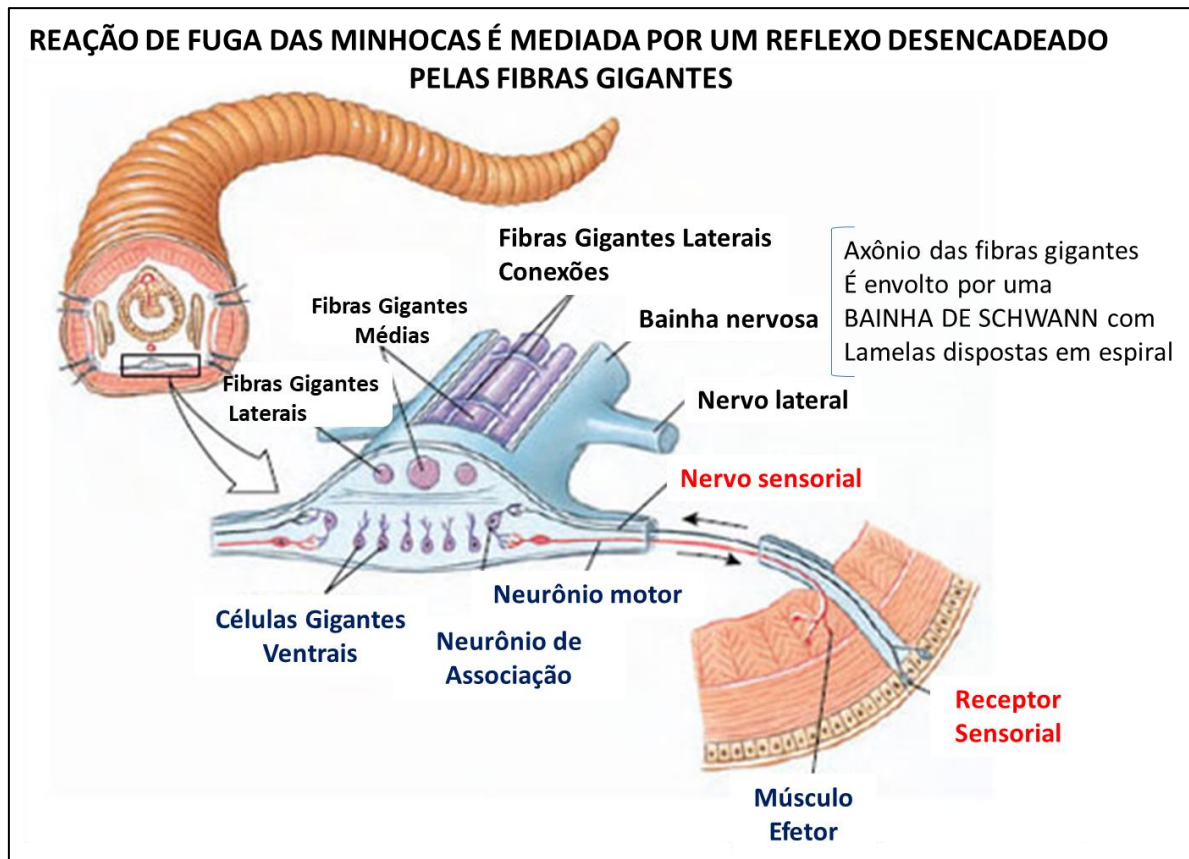
Apesar do comportamento de fuga estar evolutivamente fixado nos animais de grupos taxonomicos complexos, em especial em mamíferos, protocolos experimentais comportamentais utilizando o reflexo de fuga de minhocas não são comumente utilizados. Provavelmente pela dificuldade na sua quantificação do mesmo, já o mesmo ocorre em velocidade relativamente alta. Entretanto, em um estudo relativamente recente, Halwasia e colaboradores (2018) descreveram um teste de fuga rápida em *E.fetida* utilizando cloreto e sódio que é um repelente gustativo para o organismo, capaz de induzir resposta locomotora. A partir de protocolos em que foram feitas lesões corporais na minhoca, os autores também mostraram que a deambulação é contralada pelo cordão nervoso ventral. Ou seja, se o cordão nervos ventral é danificado a resposta de fuga rápida ao cloreto de sódio (NaCl) fica comprometida.

Por outro lado, comportamentos de evitação de minhocas são amplamente utilizados em nível experimental. Testes de evitação são feitos quando se permite que minhocas optem em escolher deixar um local com algum tipo de alteração abiótica, como luz intensa ou condições químicas do solo indesejáveis, principalmente no caso da presença de poluentes como pesticidas. Uma grande quantidade de estudos posteriores popularizaram estes testes de evitação, que passaram a ser incluídos como protocolos padronizados e validados pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD, 1984, 2018) e pela *International Organization for Standardization* (ISO N° 17512-1, 2008) para estudos de ecotoxicidade de solos. No Brasil, o ensaio de evitação de minhocas também foi validado a fim de se avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas (ABNT NBR ISO-15537, 2014).

Devido à simplicidade de seus circuitos neurais, pesquisadores têm conseguido rastrear as alterações até níveis sinápticos ou mesmo moleculares ao analisar formas primitivas de comportamento (HAWKINS et al. 2006). Segundo a revisão sobre tema conduzida por Shi et al (2017) a minhoca pode ser usada como um “biomarcador de ecotoxicidade” em diferentes cenários.”

Com base nestes resultados, o presente estudo também inferiu que a minhoca poderia ser utilizada como biomarcador em estudos da associação entre estresse comportamental, estresse oxidativo e resposta imune, via análise de comportamentos de perigo que levam a formação de fuga rápida e formação de agrupamentos seguido de comportamento de evitação.

Figura 19- Arco-reflexo de fuga de minhocas.



Fonte: Adaptado de University of Colorado Boulder (Disponível em: < <https://iphy3435fa13mondayamjimgroup2.weebly.com/introduction.html> >)

2.9.1.3 Sistema imune das minhocas

O sistema imune das minhocas tem sido estudado por mais de 40 anos. Neste período foi observado que este sistema possui componentes humorais e celulares geneticamente controlados, ainda que a morfologia e a origem dos diferentes tipos celulares ainda não estejam claramente elucidadas (GHOSH, 2018). Deste modo, ainda não existe um conhecimento universalmente aceito em relação aos componentes do sistema imune das minhocas. Entretanto, é importante destacar que todos os tipos de celomócitos podem reconhecer materiais estranhos (patógenos ou poluentes, por exemplo) e realizar fagocitose e encapsulamento (Figura 20).

Ghosh (2018) considera que a minhoca possui os seguintes componentes celulares no seu sistema imune: celomócitos como células clorogênicas, eleócitos, granulócitos, células natural-killer (NK) e células efetoras natural-killer. Um estudo conduzido por Engelmann et al (2016) utilizando anticorpos monoclonais levou a identificação de dois grandes grupos celomócitos: pequenos e grandes celomócitos. Os pequenos celomócitos mostraram

biomarcadores positivos para diversas citocinas relacionadas a resposta inflamatória: CD11a, CD45RA, CD45RO, CDw49b, CD54, beta (2)-m, Thy-1 (CD90), CD24 e TNF- α . Os celomócitos grandes parecem não expressar estas citocinas e possuem uma grande atividade fagocítica. Em ambos os grupos não foram observados marcadores de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês major histocompatibility complex) classe I e II. Outros autores consideram que os amebócitos se originam dos celomócitos e apresentam tanto a função fagocítica quanto de produção de citocinas, similar ao observado em macrófagos humanos (IRIZAR et al., 2015).

Eleócitos também são células que se originam de celomócitos progenitores. Os eleócitos quando estão completamente diferenciados se transformam em células cloragogênicas, podem formar estruturas conhecidas como cloragossomas. Estas células são auto-fluorescentes já que acumulam no seu interior riboflavina e tem a capacidade de acumular moléculas estranhas, sendo mais sensíveis a poluentes quando comparados com os amebócitos (IRIZAR et al., 2015). Além disso, os eleócitos derivados do tecido cloragogênio são responsáveis por manter o pH constante do líquido celolômico e o armazenamento de glicogênio e lipídios (HOMA et al., 2016). Como ainda não existe uniformização no padrão de células imunes das minhocas, no presente estudo apenas dois grandes grupos de células foram considerados: os eleócitos e os celomócitos.

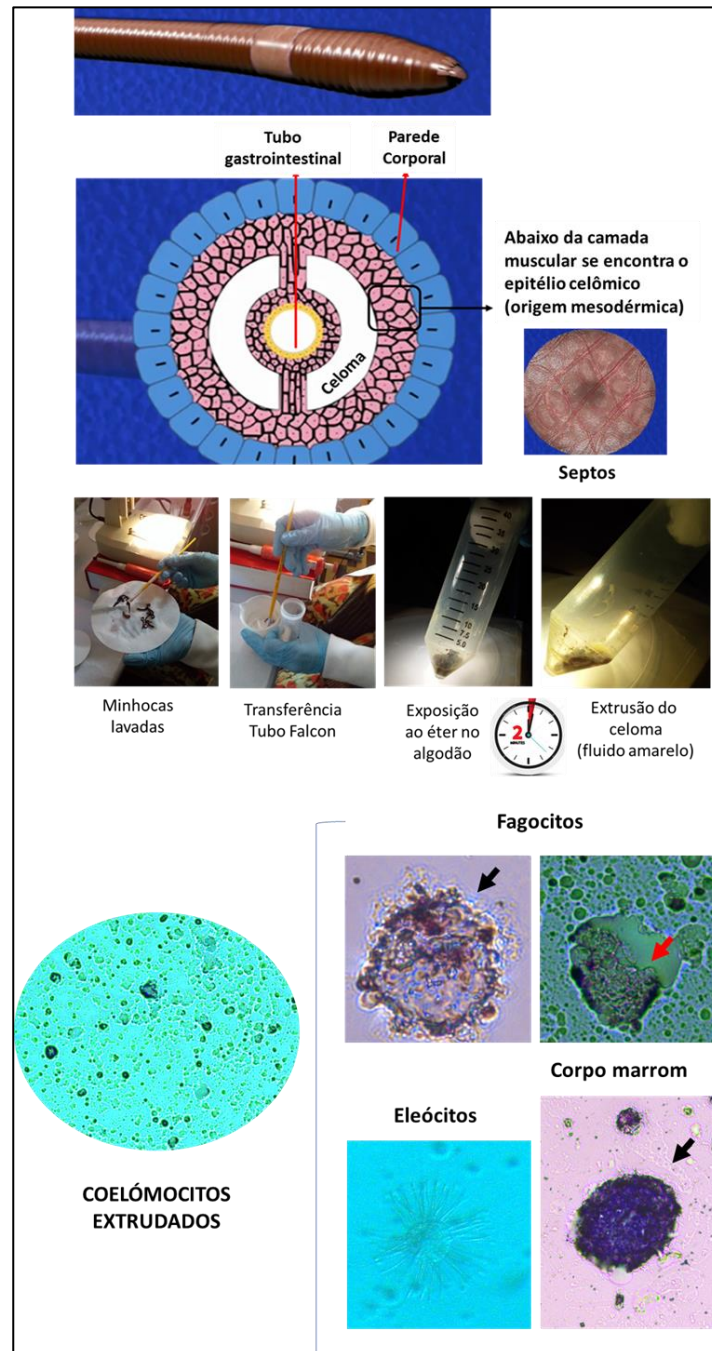
Semelhante aos vertebrados, as células imunocompetentes de invertebrados também possuem a capacidade de combater patógenos usando EROs, como radicais superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio, e óxido nítrico via fagocitose (HOMA et al., 2016). Entretanto, existe um outro mecanismo de defesa que invertebrados apresentados denominado encapsulamento. O encapsulamento é um processo encontrado em alguns animais invertebrados, que leva a formação de estruturas conhecidas como corpos marrons. A formação dos corpos marrons na cavidade celômica resulta de uma agregação de vários tipos de celomócitos em torno de células estranhas, como bactérias, algas, fungos, fragmentos de enxertos teciduais incompatíveis, estruturas corporais alteradas como cerdas ou células musculares necróticas (ENGELMANN et al., 2004; FIELD et al., 2004; RAY et al., 2011; WANG et al., 2012). O nódulo inicial aumenta rapidamente em volume pela agregação de novos celomócitos e várias partículas de resíduos. Quando um corpo marrom atinge um diâmetro de 1-2 mm, suas células externas achatam-se e perdem sua aderência e seu pigmento escurece rapidamente. Neste momento, os corpos celômicos ficam nadando no líquido celômico e começam a se acumular na parte caudal do animal. O acúmulo de corpos marrons induz autotomia esta região para liberar estes materiais não desejáveis. A perda da porção

posterior é rapidamente regenerada. Considera-se que os corpos marrons desempenham um papel importante na homeostase (VALEMBOIS et al., 1992)

Deste modo, na presença de um agente estranho quanto mais rápido e maior for a formação do corpo marrom, mais imunologicamente eficiente este organismo se apresenta. Um estudo recente conduzido por Alves et al., (2019) mostrou que a exposição a bebidas cafeinadas, como o café, chá verde e preto, guaraná e erva-mate aumentavam a eficiência dos celomócitos em capturar leveduras mortas e formar corpos marrons. Assim, este trabalho indicou então que, moléculas bioativas poderiam auxiliar a melhorar a resposta antimicrobiana destes animais.

Minhocas também apresentam um processo de captura e destruição de patógenos descritos em neutrófilos humanos que está associado liberação para o exterior dos conteúdos dos grânulos presentes no interior destas células. Este conteúdo, leva a formação de uma rede extracelular feita de DNA dupla-fita (DNA extracelular, extDNA), histona H3 e diversos tipos de proteínas incluindo moléculas antimicrobianas e de choque térmico (HSP27). Em humanos esta estrutura parecida a uma teia de aranha é denominada NET (do inglês, *neutrophil extracellular trap*), em minhocas é apenas conhecida como ETs (HOMA et al., 2016). Estudos conduzidos por Homa et al (2013; 2016) mostraram que as ETs lançadas por *E.fetida* capturam agentes microbianos, em especial bactérias de modo dependente e independente de EROs. Além disto, as ETs se interconectam mantendo os celomócitos agregados, em um processo que antecede o encapsulamento e formação dos corpos marrons. Alves et al (2019) também observaram que a suplementação com bebidas cafeinadas aumentavam a competência de formação de NETs em neutrófilos isolados de seres humanos e ETs em minhocas, ambos expostos a leveduras mortas.

Figura 20 -A cavidade celômica da minhoca é preenchida por líquido e um conjunto de células denominadas celomócitos e células clorogênicas eleócitos. Este líquido amarelado pode ser extrudado do interior da minhoca através da rápida exposição (2 minutos) a um agente irritante, como o éter. Existem diversos tipos de celomócitos e, junto com os eleócitos realizam fagocitose e formam agregados de células que capturam e destroem patógenos. Estes agregados produzem redes extracelulares de DNA e proteínas (ETs) que ajudam a manter os celomócitos unidos. Quando atingem um determinado tamanho, os agregados celulares rapidamente escurecem pela ação da melanina e se soltam. Posteriormente são eliminados por autotomia da região caudal da minhoca. Estas estruturas conhecidas como corpos marrons são formadas por um processo conhecido em vertebrados que é denominado encapsulamento.



Fonte: Laboratório Biogenômica (UFSM)

O sistema imune das minhocas também contém componentes humorais que incluem moléculas antibacterianas, proteínas citotóxicas, citocinas que participam da fagocitose, do encapsulamento, coagulação e lise (GHOSH, 2016). Entre estes fatores liberados pelos celomócitos estão enzimas lisossômicas fagocíticas, liseína, fetidina, proteína citolítica formadora de poros, hemolisinas, fator mitogênico de celomócitos (CMF) receptores de reconhecimento, fator citolítico de celomócitos (CCF) que desencadeiam a cascata antimicrobiana da pró-fenoxidase, peptídios antimicrobianos incluindo a lumbricina, moléculas hemolíticas H(1), H(2), e H(3).

2.10 O DESBALANÇO SUPEROXIDO-PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA OXIDATIVA, IMUNE E DE RESILIÊNCIA DE MINHOCAS

Estudos prévios relacionados ao polimorfismo Val16Ala-SOD2 têm mostrado estreita associação entre resposta inflamatória com os genótipos VV e AA. Entretanto, enquanto que o genótipo VV parece estar associado a respostas inflamatórias crônicas de baixo-grau, que caracteriza DCNTs metabólicas como a obesidade, hipercolesterolemia e diabetes mellitus tipo 2, o genótipo AA parece estar associado a uma resposta inflamatória mais intensa e aguda (BARBISAN et al., 2017). Esta evidência corrobora investigações que relataram que portadores do genótipo AA possuem maior risco de septicemia (PALUDO et al., 2013). Então, é possível inferir que níveis basais elevados de superóxido poderiam influenciar a resposta oxidativa, inflamatória e comportamental das minhocas.

Isto porque, tanto o óxido nítrico quanto o superóxido possuem diversos efeitos na modulação da resposta inflamatória. Estas moléculas afetam praticamente todas as fases da inflamação. Níveis baixos de óxido nítrico inibem a expressão de moléculas de adesão, síntese de citocinas e quimiocinas e a transmigração de leucócitos. Por outro lado, quantidades elevadas de óxido nítrico podem ser tóxicas e pró-inflamatórias (GUZIK et al., 2003). Como o genótipo VV está associado a maior produção de superóxido que reage rapidamente com o óxido nítrico, é possível que esta situação acabe tornando a finalização da resposta inflamatória ineficiente, contribuindo assim para a ocorrência de estados inflamatórios crônicos e baixo-grau.

No contexto neuropsiquiátrico, alterações no metabolismo superóxido-peróxido de hidrogênio poderiam então contribuir para o risco de maior suscetibilidade ao estresse crônico e a depressão. Baseado nesta premissa, autores como Galecki e Talarowska (2018) apoiam a “teoria inflamatória da depressão”. Uma vez que a regulação dos níveis mitocondriais

superóxido-peróxido de hidrogênio é crucial para organismos aeróbios, é possível que em face a este fenômeno, animais primitivos como as minhocas também apresentem alterações oxidativas e comportamentais importantes. Para estudar este fenômeno via modelo farmacológico em *E.fetida*, duas moléculas ativas foram escolhidas: a rotenona e a porfirina.

A rotenona, é um pesticida conhecido por ser um potente inibidor do complexo mitocondrial I aumentando a geração de ânion superóxido (XIONG et al., 2012). É um composto hidrofóbico que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, causando distúrbios no SNC. Numerosos estudos demonstraram que a administração de rotenona (de 0,1 nM a 10 µM) por um período de 12 horas a neurônios cultivados em mesencéfalo embrionário de ratos de 14 dias *in vitro* induz apoptose seletiva em neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos (REN et al., 2005; REN E FENG, 2007). Nessa linha, um resultado semelhante foi obtido quando as células do neuroblastoma SH-SY5Y foram incubadas por 24 horas com 10 µM de rotenona (WU et al., 2018).

Portanto, a rotenona tem sido utilizada para o desenvolvimento de modelos experimentais de doenças humanas em especial a doença de Parkinson (TANNER et al., 2011) e também para mimetizar *in vitro* disfunções mitocondriais em neurônios SH-SY5Y relacionadas com o transtorno bipolar (alterações no complexo 1 da fosforilação oxidativa) e esquizofrenia (alterações no complexo 2 da fosforilação oxidativa) (SCOLA et al., 2014; KIM et al., 2015). Investigações complementares conduzidas por Machado et al (2016; 2019) mostraram que a rotenona poderia ser neurotóxica e induzir estados inflamatórios em macrófagos RAW. Os autores também que tais efeitos negativos poderiam ser revertidos por extrato do açaí, um fruto amazônico com grande capacidade antioxidante e antiinflamatória.

Um estudo recente conduzido por Subaraja e colaboradores (2019) investigou os efeitos da rotenona nos glânglios cerebrais da minhoca *Lumbricus terrestris*, que guarda grandes similaridades estruturais, funcionais e evolutivas com a *E.fetida*. Anormalidades motoras desencadeadas pela exposição a rotenona por um período de sete dias foram relatadas. A rotenona alterou a expressão gênica dos receptores GABA, colinérgicos, do transportador da serotonina, da acetilcolinesterase (AChE) e da dopamina-β-hidrolase foi também avaliada, além da expressão de genes mitocondriais neuronais (citocromo C oxidase-2, NADH desidrogenase-1, citocromo-b) e actina-1 que são essenciais para a regeneração. Os resultados mostraram que a rotenona a 0,3 ppm promoveu alterações comportamentais e na expressão dos mRNAs estudados indicando que nesta concentração esta substância poderia, além de causar deterioração nas funções motoras causar alterações cognitivas da minhoca.

Como ocorreu uma diminuição na expressão dos receptores GABAérgicos e do transportador da serotonina, e os comportamentos de fuga e evitação são controlados por circuitos neuronais de interneuronios gigantes e função mecanosensorial onde estes neurotransmissores são chaves (DING et al., 2001) é possível que o aumento nos níveis de superóxido pela exposição a rotenona altere a resposta comportamental de fuga rápida e evitação. Considerando estudos prévios que relataram associação entre o genótipo VV-SOD2 e depressão, é possível inferir que a exposição a rotenona poderia aumentar a responsividade da minhoca a situações de estresse.

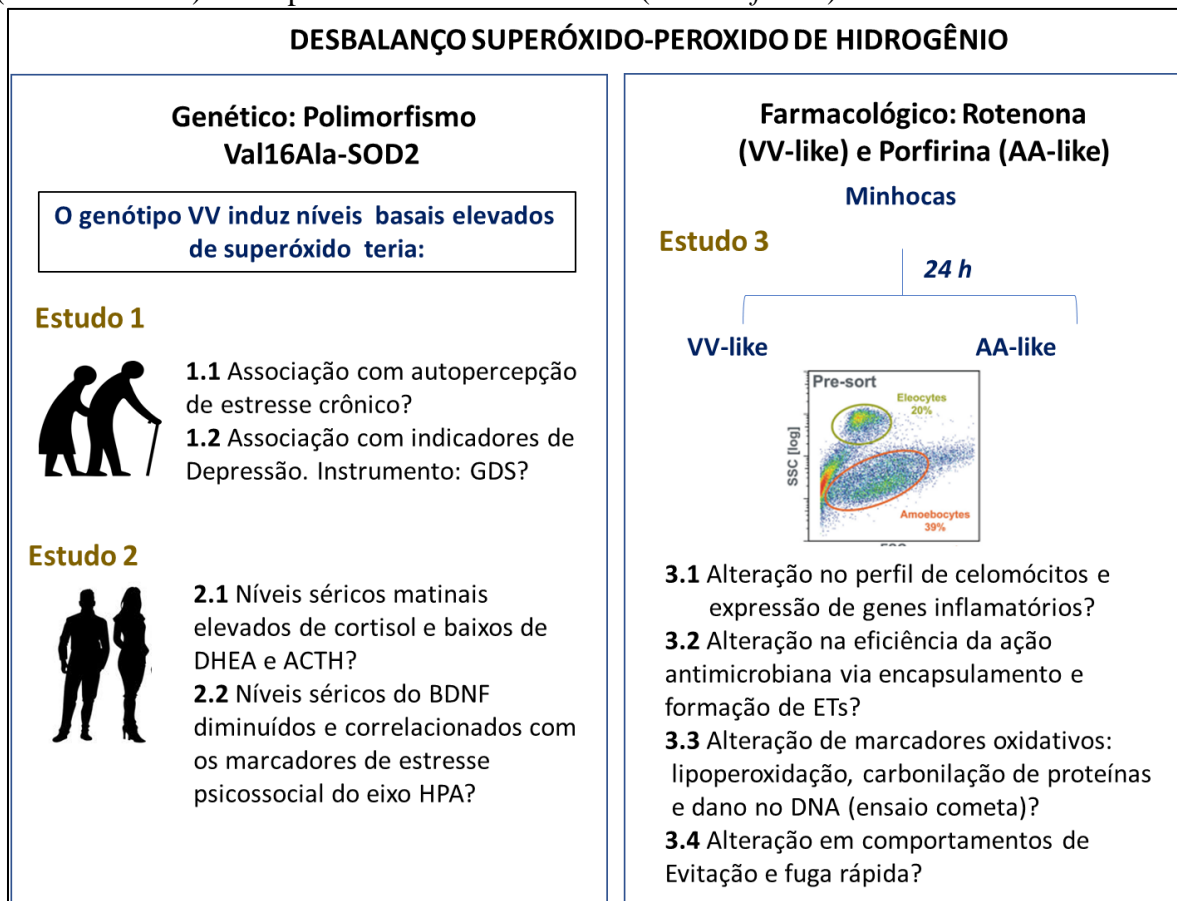
Para induzir aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio associado com a atividade da enzima SOD foi utilizada a porfirina, uma molécula mimética da SOD2. É importante salientar que para que uma molécula imite esta enzima ela deve catalizar alvos biológicos (no caso o superóxido) com uma taxa constante comparável a enzima endógena SOD. Faulkner e colaboradores (1994) foram os primeiros pesquisadores a determinar a atividade biológica de várias porfirinas que possuem ação mimética a SOD (TOVMASYAN et al., 2011). A porfirina tem sido utilizada em modelos *in vitro* para mimetizar especialmente a SOD2 em células cancerosas e não-cancerosas (BERTO et al., 2015; AZZOLIN et al., 2016; JOBIM et al., 2019). Uma investigação conduzida por Doran et al (2017) também avaliou o efeito do estresse oxidativo na mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* exposta a porfirina e ao paraquat, que aumenta os níveis de superóxido. Os resultados mostraram que estas moléculas induzem alterações metabólicas específicas. Entretanto, investigações avaliando o efeito da exposição a porfirina em minhocas não foram identificadas até o presente momento. Uma vez que, o peróxido de hidrogênio é uma molécula formada durante a lesão tecidual e que funciona como um sinal precoce de dano físico desencadeando assim processos de cicatrização, é possível que o aumento nos níveis desta EROs também altere a resposta comportamental da minhoca a exposição ao estresse.

2.11 DELINEAMENTO METODOLÓGICO GERAL

Com base na revisão de literatura conduzida que subsidiou as principais hipóteses deste estudo foi organizado um delineamento geral da investigação translacional que testou a influência do desbalanço S-HP em indicadores de resiliência de idosos, adultos e minhocas. Em idosos, os indicadores testados foram a associação entre o polimorfismo Val16Ala-SOD2 com depressão e autopercepção de estresse psicossocial em idosos. Em adultos jovens foi avaliado o efeito do polimorfismo Val16Ala-SOD2 nos níveis plasmáticos matinais de

marcadores do estresse e da função neural. Em minhocas, um desbalanço farmacológico S-HP desencadeado pela exposição a rotenona e a porfirina avaliou o efeito na modulação de marcadores oxi-inflamatórios, na eficiência da resposta antimicrobiana e na responsividade comportamental ao estresse hídrico.

Figura 21 Delineamento geral do estudo translacional no qual foi averiguado o efeito do desbalanço do superóxido-peróxido de hidrogênio em marcadores do estresse psicossocial (seres humanos) e comportamentais em minhocas (*Eisenia fetida*).



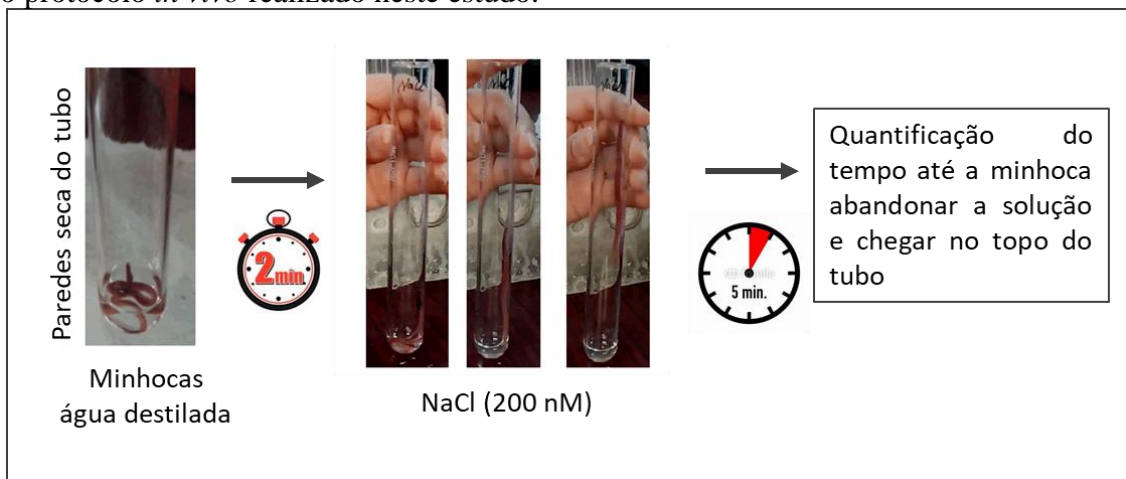
Fonte: O autor

No primeiro estudo foi feita uma análise caso-controle em que as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo Val16Ala-SOD2 foi comparada em idosos com e sem depressão e idosos que autorelataram estarem sob estresse psicossocial crônico. Um segundo estudo avaliou o quanto o polimorfismo Val16Ala-SOD2 poderia influenciar os níveis matinais de marcadores plasmáticos do eixo HPA (cortisol, ACTH e DHEA) e da função neural (BDNF) em adultos jovens saudáveis e sem histórico de disfunções e transtornos psiquiátricos prévios ou situações de estresse psicossocial crônico. No caso, investigações envolvendo efeito em marcadores do estresse oxidativo e inflamatório não foram conduzidas nestes estudos já que a associação entre este SNP e tais marcadores está bem descrita na literatura (TAUFER et al.,

2005; MONTANO et al., 2009; DUARTE et al., 2010; MONTAGNER et al., 2010; DUARTE et al., 2016; BARBISAN et al., 2018).

Já nas minhocas, foi também avaliado o efeito em marcadores de estresse oxidativo (lipoperoxidação, carbonilação de proteínas e dano no DNA), no padrão de células imunes (celomócitos e eleócitos) e na eficiência da resposta inflamatória de celomócitos expostos a leveduras mortas, em um protocolo similar ao descrito por Alves et al (2019). Um ensaio de evitação por fuga rápida modificado a partir de Halwasia et al (2018) (Figura 22) e um ensaio de agrupamento/desagrupamento modificado a partir de Zirbes et al (2016) foram realizados para avaliar o efeito do estresse também foi conduzido.

Figura 22- Ensaio de fuga rápida de minhocas de uma solução salina (NaCl) no qual foi baseado o protocolo *in vivo* realizado neste estudo.



Fonte: Modificado de Halwasia et al., 2018

3 RESULTADOS


Os resultados estão descritos sob a forma de 3 artigos científicos já publicados.

Artigo 1 – Publicado na Molecular Genetics & Genomics Medicine, Fator de Impacto = 2.448
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7005615/pdf/MGG3-8-e1080.pdf>>

Artigo 2 – Publicado no Genetics and Molecular Research , Fator de Impacto = 1.038.
Disponível em: < https://www.geneticsmr.com/sites/default/files/articles/year2020/vol19-2/pdf/gmr18586_val16ala-sod2-polymorphism-modulates-hypothalamic-pituitary-adrenal-axis-molecules-and-bdnf.pdf>.

Artigo 3 – Publicado no Chemosphere Journal , Fator de Impacto 5.77. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653520329106?via%3Dihub>>.

Superoxide imbalance triggered by Val16Ala-SOD2 polymorphism increases the risk of depression and self-reported psychological stress in free-living elderly people

Ivo Emilio da Cruz Jung¹ | Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2} | Fernanda Barbisan^{1,2} | Alexis Trott³  | Lucien J. Houenou⁴ | Bárbara Osmarin Turra¹ | Thiago Duarte¹ | Raquel de Souza Praia⁵ | Ednea Aguiar Maia-Ribeiro⁵ | Jaqueline da Costa Escobar Piccoli⁶ | Claudia Giugliano Bica⁷ | Marta Maria Medeiros Frescura Duarte¹

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Departamento de Ciências da Vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brazil

⁴Biotechnology Department, Forsyth Technical Community College, Winston-Salem, NC, USA

⁵Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade (FUNATI), Manaus-AM, RS, Brazil

⁶Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

⁷Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

Alexis Trott, Departamento de Ciências da Vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brazil.
Email: alexistrott@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Capes); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); CNPq, Grant/Award Number: 302661/2016-6 and 400816/2016-4

Abstract

Background: Oxidative stress and chronic inflammatory states triggered by a single-nucleotide polymorphism (SNP) in superoxide dismutase manganese-dependent gene (Val16Ala-SOD2) have been associated with the risk of developing several chronic, nontransmissible diseases. However, it is still not clear whether the VV-SOD2 genotype that causes higher basal superoxide anion levels has any impact on the risk for depression and self-reported psychological stress in elderly people.

Methods: In the present study, we tested this hypothesis using a case-control study where depression was detected using the Geriatric Depression Scale-15 (GDS-15). A total of 612 Brazilian free-living elderly subjects with a mean age of 67.1 ± 7.1 years old (number of controls, C = 497, and depressive individuals, D = 115) were included in this study. All participants had similar social, health, and lifestyle variables, with the exception of polypharmacy (≥ 5 medicines daily intake), which was higher in the D group, compared to C subjects.

Results: Our results showed that the VV-SOD2 genotype significantly increased the risk for depression and psychological stress in the elderly subjects, independently of sex/gender, age, and other prior diseases and health indicators (depression risk = 1.842, 1.109–3.061 95% CI, $p = .018$). VV-subjects also had a higher daily intake of antidepressants, anxiolytics, and anti-inflammatory drugs than A-allele subjects.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc.

Conclusion: Our findings support the hypothesis that genetically induced oxidative superoxide-hydrogen peroxide imbalance may be involved in an increased risk for developing depression and psychological stress in free-living elderly people without other chronic nontransmissible diseases.

KEYWORDS

depression, elderly, psychological stress, superoxide dismutase polymorphism

1 | INTRODUCTION

Depression and psychological stress are highly prevalent in contemporary societies, mainly in elderly people (Demyttenaere et al., 2009; Kok & Reynolds, 2017; Niraula, Sheridan, & Godbout, 2017). Moreover, these conditions can affect the well-being and increase the risk of certain chronic nontransmissible diseases, such as cancer and cardiovascular morbidities (Bortolato et al., 2017; Zhang, Chen, & Ma, 2018). The convergence of psychological stress, depression, and other chronic nontransmissible diseases may be related to the establishment of inflammatory oxidative states present in all these conditions (Halaris, 2017; Kruse & Strouse, 2015).

Numerous studies have consistently suggested the existence of a bidirectional relationship between oxidative stress inflammation and these conditions (Demyttenaere et al., 2009; Liu et al., 2018; Prenderville, Kennedy, Dinan, & Cryan, 2015; Straub & Cutolo, 2018). Previous investigations have suggested that oxi-inflammatory states triggered by depression and/or chronic psychological stress appear to be associated with the elevation of reactive oxygen species (ROS) (Lopresti, Maker, Hood, & Drummond, 2014), including superoxide anion levels produced by NADPH oxidase activation or some impairment in superoxide dismutase (SOD) enzymes (Seo et al., 2012; Uchihara, Tanaka, Asano, Tamura, & Mizushima, 2016; Xie et al., 2017).

Genetic studies involving the imbalance of superoxide-hydrogen peroxide associated with a single-nucleotide polymorphism (SNP) located in the *SOD2* (OMIM: 147460), manganese-dependent enzyme gene (Val16Ala-SOD2, rs4880) have suggested an association of both AA- and AV-genotypes of this SNP with some chronic nontransmissible diseases. This association correlates with a superoxide-hydrogen peroxide imbalance that involves a higher efficiency of *SOD2* in the AA-genotype; this generates elevated basal hydrogen peroxide levels, and a lower efficiency of *SOD2* in the VV-genotype generating elevated basal superoxide levels in carriers (Bresciani, Cruz, & González-Gallego, 2015; Bresciani, González-Gallego, da Cruz, de Paz, & Cuevas, 2013). Specifically, the VV-genotype has been linked to chronic inflammatory states

with higher levels of proinflammatory cytokines, such as the interleukins, IL-1 and IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and anti-inflammatory interleukin IL-10 (Barbisan, Azzolin, & Ribeiro, 2017; Duarte et al., 2016; Montano et al., 2012). Flores et al. (2017) also suggested that the VV-genotype could increase the risk for hypercholesterolemia and higher glucose levels in patients in the late phase of stroke (>6 months).

However, studies correlating the Val16Ala-SOD2 SNP with depression are still inconclusive. While some studies have not found an association between this SNP and depression (Elbozan Cumurcu et al., 2013; Pae et al., 2006), other investigations have described a higher frequency of both VV-genotypes and depression in female subjects (Gałdecki et al., 2010) when examining the severity of depression in patients with chronic obstructive pulmonary disease (Pietras et al., 2010) as well as in adult patients with depression (Wigner et al., 2018).

Considering that oxidative stress and chronic inflammation are two processes that increase during the aging process (Picca et al., 2018), the present study postulated that the risk of both depression and psychological stress in elderly people may be influenced by superoxide-hydrogen peroxide imbalance triggered by the Val16Ala-SOD2 SNP.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | General study design

To investigate the possible effects of genetically determined superoxide-hydrogen peroxide imbalance on depression and self-reported chronic psychological stress, we performed a case-control analysis that examined the association between the Val16Ala-SOD2 SNP and depression, and self-reported psychological stress in the free-living elderly and subjects without cognitive impairment. All participants provided written informed consent, and this protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 23081.009087/2008). The work described in the present paper has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

2.2 | Genetic Analyses

The Val16Ala-SOD2 SNP of all study participants was analyzed from DNA samples using standard polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques, previously described by Montano et al. (2009). Briefly, after obtaining DNA from total peripheral blood leukocyte extraction, *SOD2* genotyping was performed following amplification of a 110-bp fragment of the human *SOD2*: 5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG-3' (sense-strand) and 5'GCGTTGATGTGAGGTTCCAG-3' (antisense-strand). Further, PCR products (10 μ l) obtained after amplification were digested with HaeIII (15 U; at 37°C, for 6 hr, Gibco Inc.) and two digested products (23 and 85 bp) were visualized on a 6% agarose gel (Amersham Biosciences Inc.) stained with ethidium bromide.

2.3 | Case-control protocol

The current protocol included a Brazilian elderly free-living community with an average age of 67.1 ± 7.1 years, (minimum = 60 years and maximum = 82 years) enrolled in third age-social groups or in geriatric social support services (Gravataí city, State of Rio Grande do Sul, Brazil). At the time the study was conducted, there were 27,453 elderly people in the city of Gravataí. Sample size calculation considering 95% confidence and a 5% margin of error estimated the inclusion of 379 elderly. However, considering a prevalence of depression estimated to be 5.8% for population, it was decided to include all elderly participants in the study who did not meet any exclusion criteria. We considered that this population does not present any significant ethnic isolation been appropriate for epidemiological studies on aging based in previous investigations performed by Da Cruz et al. (2003) and Parra et al. (2003). We did not include subjects who were bedridden, hospitalized, or who did not participate regularly in social activities outside their homes. Subjects diagnosed with cognitive decline or immobility problems due to chronic morbidities—such as stroke, Parkinson's disease, hypercholesterolemia, morbid obesity, and some types of cancer—were excluded from the study, since these morbidities are confounding factors associated with high rates of depression. Therefore, from the original databank of 1,058 elderly people previously studied by Montano et al. (2009), 612 subjects were included in the present analysis. Notably, as Brazil is a middle-income country, the World Health Organization considers elderly people to be those ≥ 60 years old (WHO, 2015).

Depression in the elderly sample was diagnosed using the Geriatric Depression Scale-15 (GDS-15), previously validated in Portuguese (Almeida & Almeida, 1999), which

is able to achieve early detection of depression in primary care and other health care settings. GDS is an instrument broadly used to diagnose depression in elderly people, and several studies have demonstrated that GDS offers valid and reliable measures for the evaluation of depressive disorders (Dorow et al., 2018). The Portuguese version of the GDS with 15 questions (GDS-15) offered valid measurements for the diagnosis of major depressive episodes according to the International Classification of Diseases (ICD-10) and the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV) criteria using a 5/6 cutoff point (noncase/case) (Almeida & Almeida, 1999), which was also predicted previously by Hermann et al. (1996). The 5/6 cutoff point (noncase/case) for the GDS-15 produced sensitivity indices of 85.4% and a specificity of 73.9% for the diagnosis of depressive episodes, according to the ICD-10 (Almeida & Almeida, 1999). An evaluation of 23 studies performed by Pocklington, Gilbody, Manea, and McMillan (2016) indicated that a cutoff score of 5 points was appropriate for the GDS-15. However, it is important to be cautious about the classification of elderly depressive episodes using this cutoff point. Some studies, such as the one performed by Sugishita, Sugishita, and Hemmi (2017), suggested that a higher cutoff point (6/7) could be more accurate for diagnosis of a depressive episode in elderly people. Therefore, in the present study, we decided to use the 6/7 cutoff point.

Self-perception of current psychological stress was also considered in our analysis. Two physicians and one psychologist determined the GDS score and self-perception of psychological stress, whereas health professionals conducted a structured interview with questions regarding social, health, and lifestyle variables. Subjects with chronic or noncontrolled diseases that could influence the results were excluded. Since the study includes genetic variables, the subjects were recruited based on a random selection of Brazilians of European ancestry from State of Rio Grande do Sul. All subjects provided written informed consent, and our protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil (number 23081.009087/2008).

Demographic and social variables were considered covariates in the study. Moreover, the following co-variables that could exert some influence on the association of Val16Ala-SOD2 SNP with depression were considered in the analysis, since previous reports have shown an association between these variables and the polymorphism studied here. These variables include, obesity determined by body mass index (BMI, Kg/m^2) (Hernández-Guerrero et al., 2016; Montano et al., 2009) or obesity-related metabolic markers (Becer & Çirakoğlu, 2015), hypercholesterolemia (Chen et al., 2012; Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2016; Flores et al., 2017), and diabetes mellitus type 2 and its complications

(Gottlieb et al., 2005; Huang, Lyu, Liu, Chen, & Wang, 2017; Möllsten, Jorsal, Lajer, Vionnet, & Tarnow, 2009; Li et al., 2015; Pourvali, Abbasi, & Mottaghi, 2016; Rizvi, Raza, & Mahdi, 2014).

Furthermore, the following three co-variables were also considered despite a lack of specific associative studies between them and Val16Ala-SOD2 polymorphism: hypertension, smoking, and polypharmacy. Previous reports describe an association between the Val16Ala-SOD2 SNP and cardiovascular diseases (Flores et al., 2017; Fujimoto, Kobayashi, Ogasawara, Yamakado, & Ohno, 2010; Fujimoto et al., 2008; Kakko et al., 2003; Karahalil, Elkama, & Orhan, 2017; Souiden et al., 2016), for which hypertension and smoking habits are important risk factors. Regarding polypharmacy, consistent evidences exist supporting an association between certain pharmacological drugs and body weight modulation, including antidepressants (Abosi, Lopes, Schmitz, & Fiedorowicz, 2018) and antipsychotic drugs, which are sometimes prescribed to depressive elderly patients (Dayabandara et al., 2017).

2.4 | Statistical analyses

Data analysis was performed with SPSS (version 22.0.1; SPSS Inc.). Initially, the Hardy–Weinberg equilibrium was tested using a Chi-squared test in which observed and expected genotype frequencies were compared. Univariate association of *SOD2* genotypes and V- or A-allele frequencies with depression and self-reported psychological stress was also determined using Chi-squared or Fisher test. Quantitative variables were compared among genotypes using analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post hoc test. Considering that the elderly can present some differences related to sex/gender, age, or previous disease, and because some chronic diseases have previously been associated with the Val16Ala-SOD2 SNP, such as obesity and dyslipidemia, a multivariate analysis was performed using a logistic regression (backward stepwise Wald method) to determine the effect of these variables on the association between depression, psychological stress, and the *SOD2* SNP. Odds ratio values and 95% confidence intervals were also calculated. The alpha value was set at 0.05, and all *p*-values were two-tailed.

3 | RESULTS

Out of the 612 elderly subjects included in the present analysis, 115 (18.8%) were diagnosed with depression (D group), whereas 497 (81.2%) were not and used as controls (C group). The mean age of the two groups was virtually similar (D = 66.9 ± 6.5 and C = 67.2 ± 7.0 years,

TABLE 1 Genotype and allele frequencies of Val16Ala-SOD2 SNP in healthy control (C) and depressive (D) elderly subjects

Genetic	C subjects % (n)	D subjects % (n)	<i>p</i>
Genotypes			
VV	21.1 (105)	33.0 (38)	.014
AV	62.8 (312)	49.6 (57)	
AA	16.1 (80)	17.4 (20)	
Allele frequency			
V	0.525	0.665	
A	0.475	0.335	
V-allele dose effect			
AA + AV	78.8 (392)	67.0 (77)	.006
VV	21.2 (105)	33.0 (38)	

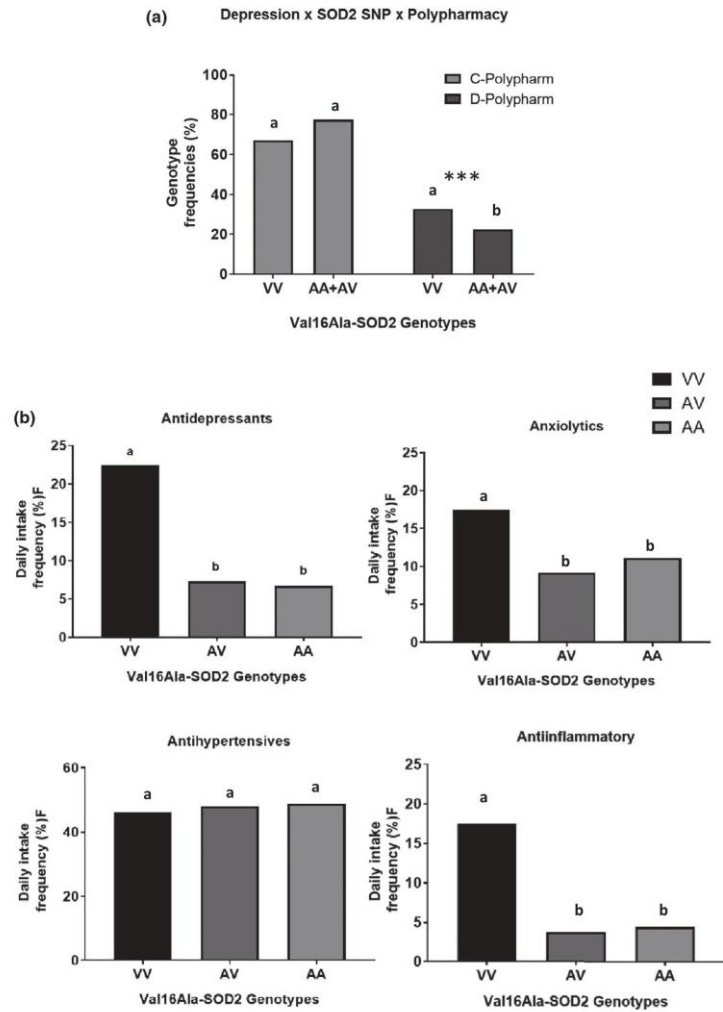
Note: Statistical comparisons were performed by Chi-squared test.

$p = .728$). Social, health, and lifestyle variables were also similar between the two groups. However, polypharmacy, that is, daily intake of ≥5 prescribed drugs, was higher in the D subjects, compared to the C group. Furthermore, subjects in group D also presented a higher prevalence of self-reported psychological stress than the subjects in group C.

Comparison of the genotypic frequency of the Val16Ala-SOD2 SNP in groups C and D elderly subjects is presented in Table 1, which shows that the subjects in group D had a significantly higher VV-frequency than the healthy individuals in group C. Further analysis revealed a significant association between the VV-genotype and depression, compared to A-allele carriers. Therefore, this association presented a potential recessive pattern in the population studied here. Elderly subjects who self-reported psychological stress also had a significantly ($p = .02$) higher frequency of VV-genotypes (31.3%, $n = 47$) than controls (19.8%, $n = 51$). The relative risk (RR) for the D group of presenting VV-genotypes was 1.564 (range: 1.146 to 2.134) times higher than the RR of C controls. A multivariate analysis showed that the association between depression and the VV-genotype was independent of sex, age, and several other health variables, as shown in Table 1.

Additional analysis showed that VV-depressive subjects had a higher frequency of polypharmacy than AA- and AV-depressive subjects (Figure 1a). A complementary analysis was conducted to analyze antidepressants and other drugs used daily by 198 elderly subjects with different Val16Ala-SOD2 genotypes (Figure 1b). This analysis was performed in 198 subjects who were able to report what drugs they ingested daily. The VV-carriers reported a significantly higher frequency of daily intake of antidepressants ($p = .032$) and anti-inflammatory drugs ($p = .011$) than A-allele carriers. The RR of VV-subjects using antidepressants compared to A-allele

FIGURE 1 Val16Ala-SOD2 genotype distribution in control (C) and depressive (D) elderly subjects who presented (a) polypharmacy (daily intake of ≥ 5 medicines) and (b) hypertension (HAS) disease. The comparison was performed by univariate Chi-squared analysis. $***p < .01$. In logistic regression multivariate analysis, polypharmacy and hypertension were associated with depression diagnosis, but did not significantly influence the association between the VV-genotype and depression



subjects was 3.628 (95% CI = 1.222–10.773) independent of sex, age, BMI, and use of hypolipemic agent. The RR of VV-subjects using anti-inflammatory drugs compared to A-allele subjects was 5.636 (95% CI = 1.638–9.385) independent of sex, age, BMI, and hypolipemic agent use. However, the frequencies of antihypertensive and anxiolytic drugs, including sleeping remedies, were similar among subjects carrying different *SOD2* genotypes (see Figure 1b).

In this analysis, a total of five VV-carriers (12.8%) reported the use of statins, whereas in AV-subjects, the use of this drug was reported by six subjects (5.8%) and by one AA-subject (2.3%). These results were not significantly different among *SOD2* genotype groups ($p = .155$). The number of elderly subjects reporting the use of hypoglycemic drugs was

also similar ($p = .748$) and restricted ($n = 6$, 3.1%) in the subsample analyzed here.

4 | DISCUSSION

The present investigation found a significant association between depression and self-reported current psychological stress and the VV-genotype of the Val16Ala-SOD2 SNP. These results were independent of sex, age, and several other health variables such as diabetes, dyslipidemia, and obesity (Table 2). However, hypertension and polypharmacy were significantly associated with depression (Table 3). Despite methodological constraints related to case-control studies, our results suggested a potential association of genetic SNP

TABLE 2 Characteristics of elderly subjects with (D) and without (C) depression

Variables	C subjects % (n)	D subjects % (n)	p
Age groups (years)			
60–64	37.6 (187)	37.4 (43)	.907
65–69	27.4 (136)	30.4 (35)	
70–74	20.9 (104)	20.9 (24)	
75–79	8.9 (44)	7.8 (09)	
≥80	5.2 (26)	3.5 (04)	
Sex			
Male	21.7 (108)	19.1 (22)	.539
Females	78.3 (389)	80.9 (93)	
Marital status			
Married/ partnership	37.9 (189)	33.0 (38)	.102
Single	6.1 (30)	3.5 (04)	
Widow	46.1 (229)	58.3 (67)	
Divorced	9.9 (49)	06 (5.2)	
Education (years)			
0 < 3	11.3 (56)	13.0 (15)	.879
3 < 8	35.3 (175)	33.9 (39)	
≥8	53.4 (266)	53.0 (61)	
Diabetes mel- litus 2	11.5 (57)	15.7 (18)	.348
Hypertension	56.5 (281)	66.1 (76)	.061
Dyslipidemia	47.3 (235)	49.6 (57)	.659
Obesity	38.6 (192)	38.3 (44)	.941
Metabolic syndrome	12.9 (64)	13.9 (16)	.767
Polypharmacy	23.4 (116)	35.7 (41)	.017*
Smoking habit (current/former)	26.3 (129)	35.2 (103)	.112
Self-reported psychological stress	11.9 (59)	98.0 (116)	<.0001*

Note: C = control group; D = group with depression diagnosis; Subject numbers are shown as (n).

Statistical univariate comparison between two elderly groups was performed by Chi-squared or Fisher's exact test.

*Statistically significant difference between the C and D groups.

associated with a lower efficiency in SOD2 enzyme with neuropsychiatric conditions prevalent in elderly subjects. Consequently, some detailed considerations about these results are discussed below.

Depression is a psychiatric disease that affects a large number of people, especially the elderly, and is highly associated with suicide (Bachmann, 2018). Data from the World Mental Health Survey, conducted in 17 countries, estimated that one in 20 people present at least one episode

TABLE 3 Multivariate logistic regression analysis to determine the influence of some healthy conditions in the association between VV-SOD2 genotype and depression in elderly free-living community

Variables	Wald	Risk	95% CI	p
VV-genotype	5.562	1.842	1.109–3.061	0.018*
Sex	0.150	1.119	0.635–1.971	0.698
Age	0.756	0.385	1.015–1.049	0.982
Smoking habit	2.660	1.518	0.919–2.506	0.103
Polypharmacy	6.932	0.517	0.316–0.845	0.008*
Obesity	0.041	0.952	0.594–1.527	0.839
Dyslipidemia	1.914	1.383	0.874–2.189	0.167
Diabetes mel- litus 2	0.814	1.359	0.698–2.645	0.367
Hypertension	8.756	2.019	1.268–3.215	0.003*

Note: Multivariate analysis: logistic regression Backward Wald method.

Abbreviation: CI, confident interval.

*Statistically significant difference.

of depression throughout their lifetime (Wang et al., 2007). However, known cases of depression do not provide sufficient explanation for the underlying pathophysiology. Evidence suggests that chronic psychological stress is an important risk factor associated with the development of depression, since it is implicated in the induction of multiple behavioral, neurochemical, and biological alterations (Tagliari et al., 2010). Therefore, the association between VV-SOD2 and depression described in previous studies (Galecki et al., 2010; Pietras et al., 2010) and in the present investigation could be epidemiologically relevant.

The plausible association between SOD2 genetic imbalance and depression is based on well-documented evidence that chronic psychological stress is associated with ROS overproduction and the pathogenesis of depression (Floyd, Townner, He, Hensley, & Maples, 2011; Michel et al., 2007; Siegrist & Sies, 2017; Wei et al., 2009). Moreover, there are some investigations, such as one performed by Maes, Galecki, and Chang (2011), that reported an association between depression and impairment of antioxidant status. Therefore, the results described here regarding case-control analysis strongly support the hypothesis that basal oxidative stress conditions associated with the SOD2 SNP may have some major influence on the risk of depression in the elderly. From our results, it is possible to infer that basal oxidative imbalance associated with a genetic polymorphism could increase the susceptibility of some people in developing depressive states during old age. However, in the present investigation, we did not performed complementary investigations on levels of some oxidative blood markers that could corroborate the association between VV-genotype and depression. In fact, it is not always possible to establish a direct association between serum levels of oxidative markers including lipoperoxidation,

protein carbonylation, and DNA damage since the superoxide-hydrogen peroxide imbalance associated with the SOD2 enzyme occurs within mitochondria. However, in some previous studies conducted by our research group, we have even found some level of association between Val16Ala-SOD2 genotypes and oxidative markers. This was the case for analyzes related to the association between hypercholesterolemia and polymorphism or the pharmacogenetic effect of this polymorphism on rosuvastatin response (Duarte et al., 2010; Duarte et al., 2016). In both cases, the research volunteers were chosen because they had a very similar lifestyle, health, and dietary profile. However, in studies involving the elderly, this type of selection is very difficult to conduct as a result of the heterogeneity of this population group. For this reason, we chose not to include serum analyzes related to the oxidative profile.

Moreover, despite the potential association between the VV-genotype, which has higher basal levels of superoxide anion, it is important to point out that investigations involving this SNP in psychiatric and psychological conditions are still unclear and controversial. From the literature, we found three previous investigations that suggested some association between depression and the VV-genotype (Galecki et al., 2010; Pietras et al., 2010; Wigner et al., 2018). Other studies involving the potential association between the Val16Ala-SOD2 SNP and mood disorders failed to show a significant association between this SNP and major depressive and/or bipolar disorders. However, these studies were performed with small sample sizes (Elbozan Cumurcu et al., 2013; Pae et al., 2006).

Moreover, it is not easy to establish association studies involving the genetics of oxidative metabolism, since there are several potential intervening factors that can act as attenuators or enhancers of oxidative stress associated with psychiatric diseases. For this reason, we tried to perform a prescreening of our sample population, excluding elderly subjects who presented cognitive impairment, physical and psychological frailty, and previous chronic or noncontrolled diseases. Under these conditions, we opted to investigate depression in an elderly free-living community that participated in organized social groups. This selection could be relevant in the observation of a significant association between the SOD2 SNP and depression described in the present report.

There are several biological and psychological theories explaining the causes of depression including the hypothesis of an active inflammatory process associated with oxidative metabolism imbalance (Jeon & Kim, 2018). In relation to inflammatory response, there is consistent number of studies indicating that superoxide anion is important in this process. Superoxide anion mainly produced by NAD(P)H oxidases is present in all cell types participating in inflammation (leukocytes, endothelial, and other

vascular cells) (Zeng, Miralda, Armstrong, Uriarte, & Bagaitkar, 2019). However, basal uncontrolled superoxide concentration may lead to toxic effects, when produced at high levels during oxidative burst. This process has been associated with VV-genotype that is associated with higher risk of chronic inflammatory conditions including hypercholesterolemia, obesity, and cardiovascular diseases, such as stroke (Barbisan et al., 2017; Bresciani et al., 2015; Pascotini et al., 2018) and also depression and other mood disorders (Maes et al., 2019; Valvassori et al., 2018). As pointed out by Kalinichenko's review (2019), investigations described that psychological stress and mood disorders, especially depression, can result in abnormal immune responses accompanied by abnormal levels of ROS in the red blood cells, mononuclear cells, cerebrospinal fluid, and the brain. In this process, superoxide is considered a key molecule of inflammatory activation, and previous investigations suggested that its imbalance could directly affect the oxi-inflammatory metabolic patterns. In order to test this hypothesis, Barbisan et al. (2017) evaluated in vitro inflammatory response of peripheral blood mononuclear cells carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes. Results showed that VV-cells were associated with higher proinflammatory cytokine levels indicating a genetic role in chronic oxi-inflammatory processes. Therefore, basal higher superoxide levels in VV-subjects could explain the association between this genotype and depression previously described by Galecki et al. (2010), and in the present study.

Despite difficulties in evaluating the impact of basal oxidative imbalance on depression risk in elderly people, the findings summarized here are consistent with a recent investigation published by Wigner et al. (2018) describing a significant association between the Val16Ala-SOD2 SNP and depression in adult subjects. Similar to what was observed in the elderly subjects in our study, Wigner et al. (2018) showed that subjects with the VV-genotype presented a higher risk of depression diagnosis than AA- and AV-subjects. The authors concluded that their results supported the hypothesis that oxidative and nitrosative stress are involved in the pathogenesis of depressive disorders. Basal alteration in oxidative metabolism triggered by the VV-genotype leads to the increase of superoxide anion levels, a key molecule in inflammatory processes.

The potential association between higher superoxide anion levels and psychological stress and depression is also indirectly supported by a study in humans performed by Zuccarella-Hackl et al. (2016). These authors described an association between higher superoxide anion levels and pathogenesis of coronary artery disease, especially in patients with Type D personalities, that is, those with a tendency to experience negative emotions and to inhibit their expression in a social context.

Free-living elderly people as a group probably experience several instances of “loss”, including the death of family members or friends, the loss of social status associated with retirement, and even functional losses. Thus, elderly individuals who do not have some type of depression or more prominent depressive symptoms may be considered more resilient, whereas depressed individuals may be considered more variable. It is important to point out that we concentrated our analysis on this elderly group since elderly people who present devastating chronic, non-transmissible diseases or cognitive dysfunction have a high predisposition for developing depressive disorders as a secondary morbidity. Among these diseases are some neurodegenerative morbidities such as Parkinson's, coronary diseases, including myocardial infarction, and even some types of cancer (Nasca, Davis, Bigio, Sandi, & McEwen, 2017).

Finally, it is important to comment on some aspects of the methodological approaches used in this study, specifically the use of GDS as a tool to evaluate depression. Accurate diagnosis is essential for the management of elderly depression in primary care. For this reason, several scales have been developed, including the GDS-15, the Hospital Anxiety and Depression Scale, and the Structured Clinical Interview for DSM-V criteria. However, a recent study showed that there were high levels of inconsistency among depression diagnosis performed by different tools when more than 1,000 75+ years old patients were concomitantly assessed with these measurement scales. Despite these differences, GDS was the tool that achieved results close to those obtained by a general practitioner (GP) based on the DSM-V. Whereas the GP estimated there to be 24.3% depressive elderly subjects, the GDS-15 estimated there to be 21.8% (Dorow et al., 2018). Moreover, the GDS was previously validated in Brazil and is broadly used in geriatric anamneses for the screening and diagnosis of depression (Almeida & Almeida, 1999).

However, there are some considerations that need to be commented on regarding the GDS-15 tool. Many instruments are available to measure depression, including the GDS with 30 questions, first created by Yesavage et al. (1982), which has been tested and used extensively with elderly subjects. A shortened GDS form developed in 1986 contains 15 questions of which 10 questions indicate the presence of depression when answered positively, while five questions indicate depression when answered negatively. When the GDS-15 was created, older subjects with scores of 0–4 were considered nondepressives, those with a score of 5–8 were considered to have mild depression, 9–11 indicated moderate depression, and 12–15 indicated severe depression. However, authors such as Greenberg (2012) commented that these cutoff points could vary depending on age, education, and complaints. For this reason, studies

generally use the GDS-15 as a screening tool to identify depressive older people, and not to identify the intensity of their psychiatric condition.

Moreover, there are some concerns about the GDS-15 cutoff points with respect to depression diagnosis. Most studies consider 4/5 points to be an appropriate cutoff (Pocklington et al., 2016), whereas other studies suggest that 6/7 could be a better cutoff (Sugishita et al., 2017). Because of this, we opted to exclude from our main analysis subjects who could present an overlapping diagnosis in relation to noncase and case distributions. Not excluding these subjects could compromise the results and their interpretations, since we would be including individuals with intermediate punctuation. We understand that this strategy is a significant methodological constraint; nonetheless, we have opted to be more cautious regarding this issue in order to accurately test our main hypothesis pertaining to the association between depression and genetic oxidative imbalance.

Another factor that may be considered limiting in the present study is the following question: we found 98% of self-declaration of psychological stress in depressive subjects, there is really an association of VV-SOD2 genotype and stress, or there is a bias of the sample selection, since almost all depressive subjects are also stressed subjects? This question is really important to consider. However, we believe the association between the VV-genotype psychosocial stress and/or depression is plausible and true, and not just a sample selection bias based in the following considerations: Evidences indicate that the hyperactivity of the HPA axis that induces changes in the immune system is responsible for some of the behavioral and biochemical changes that are also typical in depression (review in Kalinichenko, Kornhuber, & Müller, 2019). Therefore, epidemiological and clinical studies have suggested strong association between psychosocial stress and depression. However, previous report estimated that only approximately 3%–5% of human individuals develop depression/anxiety after stressful life events (Wada et al., 2013). Based on these estimative, we find it important to question older people on their self-perception of chronic stress. In both cases, elderly self-reported psychosocial stresses and depressed elderly, we found higher frequency of VV-genotype indicating that this genetic factor could affect the susceptibility for mental conditions.

5 | CONCLUSIONS

The results described in the present report, strongly suggest the association between Val16Ala-SOD2 SNP and risk of depression and self-reported psychological stress in elderly subjects, independent of other prevalent noncommunicable

chronic diseases. Considering previous evidence, this association could be related to the increase of basal oxidative stress and/or inflammatory states prevalent in VV-subjects. This association also seems to influence the daily intake of prescribed drugs by older subjects.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Coordenação de Apoio de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) through our grant (processes numbers: 302661/2016-6; 400816/2016-4) and fellowships.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHORS CONTRIBUTION

Ivo Emilio da Cruz Jung—Mainly responsible for execution of study, writing the manuscript. Ivana da Cruz—Co-responsible for execution of study, data collection, writing the manuscript study design and statistical analysis. Alexis Trott—Standardization of Val16Ala-SOD2 genotyping, writing the manuscript, corresponding author. Fernanda Barbisan—Data collection. Lucien Houenou—Review of methodological design, statistical analysis, English editing manuscript. Bárbara Osmarin Turra—Genotyping, databank organization. Thiago Duarte—Genotyping, databank organization. Raquel de Souza Praia—Data collection. Ednea Aguiar Maia-Ribeiro—Data collection. Jaqueline da Costa Escobar Piccoli—Data collection. Claudia Giugliano Bica—Population data collection. Marta Maria Medeiros Frescura Duarte—Scientific coordinator of Project, responsible for study design and statistical analysis.

ORCID

Alexis Trott  <https://orcid.org/0000-0002-3353-5066>

REFERENCES

- Absoli, O., Lopes, S., Schmitz, S., & Fiedorowicz, J. G. (2018). Cardiometabolic effects of psychotropic medications. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *36*, 1–15. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2017-0065>
- Almeida, O. P., & Almeida, A. S. (1999). Reliability of the Brazilian version of the ++abbreviated form of geriatric depression scale (GDS) short form. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*, *57*, 421–426. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X1999000300013>
- Bachmann, S. (2018). Epidemiology of suicide and the psychiatric perspective. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*, 1425. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071425>
- Barbisan, F., Azzolin, V. F., Ribeiro, E. E., Duarte, M. M. M. F., & da Cruz, I. B. M. (2017). The *in vitro* influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on immunosenescence. *Rejuvenation Research*, *20*, 334–345. <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1892>
- Becer, E., & Çirakoğlu, A. (2015). Association of the Ala16Val MnSOD gene polymorphism with plasma leptin levels and oxidative stress biomarkers in obese patients. *Gene*, *568*, 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.009>
- Bortolato, B., Hyphantis, T. N., Valpione, S., Perini, G., Maes, M., Morris, G., ... Carvalho, A. F. (2017). Depression in cancer: The many biobehavioral pathways driving tumor progression. *Cancer Treatment Reviews*, *52*, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.11.004>
- Bresciani, G., da Cruz, I. B. M., & González-Gallego, J. (2015). Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Advances in Clinical Chemistry*, <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.001>
- Bresciani, G., González-Gallego, J., da Cruz, I. B., de Paz, J. A., & Cuevas, M. J. (2013). The Ala16Val MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise. *Clinical Biochemistry*, *46*, 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.11.020>
- Chen, H., Yu, M., Li, M., Zhao, R., Zhu, Q., Zhou, W., ... Liu, L. (2012). 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. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *363*, 85–91. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1160-3>
- Da Cruz, I. B. M., Oliveira, G., Taufer, M., Leal, N. F., Schwanke, C. H., Glock, L., ... Moriguchi, E. H. (2003). Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in two ethnic groups living in Brazil's southern region: Association with age. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *58*, M851–M856. <https://doi.org/10.1093/gerona/58.9.M851>
- Dayabandara, M., Hanwella, R., Ratnatunga, S., Seneviratne, S., Suraweera, C., & de Silva, V. A. (2017). Antipsychotic-associated weight gain: Management strategies and impact on treatment adherence. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *13*, 2231–2241. <https://doi.org/10.2147/NDT.S113099>
- Demyttenaere, K., Verhaeghen, A., Dantchev, N., Grassi, L., Montejo, A. L., Perahia, D. G., ... Bauer, M. (2009). "Caseness" for depression and anxiety in a depressed outpatient population: Symptomatic outcome as a function of baseline diagnostic categories. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*, *11*, 307–315. <https://doi.org/10.4088/PCC.08m00748blu>
- Dorow, M., Stein, J., Pabst, A., Weyerer, S., Werle, J., Maier, W., ... Riedel-Heller, S. G. (2018). Categorical and dimensional perspectives on depression in elderly primary care patients – Results of the AgeMooDe study. *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, *27*, e1577. <https://doi.org/10.1002/mpr.1577>
- Duarte, M. M. M. F., Moresco, R. N., Duarte, T., Santi, A., Bagatini, M. D., Da Cruz, I. B. M., ... Loro, V. L. (2010). Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clinical Biochemistry*, *43*, 1118–1123. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.002>
- Duarte, T., da Cruz, I. B. M., Barbisan, F., Capelleto, D., Moresco, R. N., & Duarte, M. M. M. F. (2016). The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytics blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. *The Pharmacogenomics Journal*, *16*, 501–506. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.91>

- Elbozan Cumurcu, B., Ozyurt, H., Ates, O., Gogcegoz Gul, I., Demir, S., & Karlıdag, R. (2013). Analysis of manganese superoxide dismutase (MnSOD: Ala-9Val) and glutathione peroxidase (GSH-Px: Pro 197 Leu) gene polymorphisms in mood disorders. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, *13*, 109–113. <https://doi.org/10.17305/bjbm.2013.2390>
- Flores, A. E., Pascotini, E. T., Kegler, A., Gabbi, P., Bochi, G. V., Barbisan, F., ... Figuera, M. R. (2017). ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: Association with dyslipidemia and glucose levels. *Gene*, *627*, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.05.055>
- Floyd, R. A., Towner, R. A., He, T., Hensley, K., & Maples, K. R. (2011). Translational research involving oxidative stress and diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*, 931–941. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.014>
- Fujimoto, H., Kobayashi, H., Ogasawara, K., Yamakado, M., & Ohno, M. (2010). Association of the manganese superoxide dismutase polymorphism with vasospastic angina pectoris. *Journal of Cardiology*, *55*, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.jcc.2009.10.011>
- Fujimoto, H., Taguchi, J.-I., Imai, Y., Ayabe, S., Hashimoto, H., Kobayashi, H., ... Ohno, M. (2008). Manganese superoxide dismutase polymorphism affects the oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis of macrophages and coronary artery disease. *European Heart Journal*, *29*, 1267–1274. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm500>
- Galecki, P., Śmigiełski, J., Florkowski, A., Bobińska, K., Pietras, T., & Szemraj, J. (2010). Analysis of two polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene (Ile-58Thr and Ala-9Val) in patients with recurrent depressive disorder. *Psychiatry Research*, *179*, 43–46. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2009.06.016>
- Gottlieb, M. G., Schwanke, C. H., Santos, A. F., Jobim, P. F., Müssel, D. P., & da Cruz, I. B. (2005). Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genetics and Molecular Research*, *4*, 691–703. <https://doi.org/10.1016/j.gmr.2005.06.016>
- Halaris, A. (2017). Inflammation-associated co-morbidity between depression and cardiovascular disease. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *31*, 45–70. https://doi.org/10.1007/7854_2016_28
- Hermann, B. P., Trenery, M. R., & Colligan, R. C. (1996). Learned helplessness, attributional style, and depression in epilepsy. *Bozeman Epilepsy Surgery Consortium. Epilepsia*, *37*(7), 680–686.
- Hernández-Guerrero, C., Hernández-Chávez, P., Romo-Palafox, I., Blanco-Melo, G., Parra-Carriedo, A., & Pérez-Lizaur, A. (2016). Genetic polymorphisms in SOD (rs2070424, rs7880) and CAT (rs7943316, rs1001179) enzymes are associated with increased body fat percentage and visceral fat in an obese population from Central Mexico. *Archives of Medical Research*, *47*, 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.08.007>
- Huang, L., Lyu, J., Liu, Q. P., Chen, C., & Wang, T. (2017). MnSOD Val16Ala polymorphism associated with retinopathy risk in diabetes: A PRISMA-compliant Meta-analysis of case-control studies. *International Journal of Ophthalmology*, *10*, 639–645. <https://doi.org/10.18240/ijo.2017.04.22>
- Jeon, S. W., & Kim, Y. K. (2018). The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder. *Journal of Inflammation Research*, *11*, 179–192. <https://doi.org/10.2147/JIR.S141033>
- Kakko, S., Päivänsalo, M., Koistinen, P., Kesäniemi, Y. A., Kinnula, V. L., & Savolainen, M. J. (2003). The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *168*, 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(03\)00091-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(03)00091-1)
- Kalinichenko, L. S., Kornhuber, J., & Müller, C. P. (2019). Individual differences in inflammatory and oxidative mechanisms of stress-related mood disorders. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *55*, 100783. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100783>
- Karahalil, B., Elkama, A., & Orhan, G. (2017). Oxidative stress gene polymorphisms may have an impact in the development of ischemic stroke. *The Journal of Gene Medicine*, *19*, e2947. <https://doi.org/10.1002/jgm.2947>
- Kok, R. M., & Reynolds, C. F. (2017). Management of depression in older adults: A review. *Journal of the American Medical Association*, *317*, 2114. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.5706>
- Kruse, J. L., & Strouse, T. B. (2015). Sick and tired: Mood, fatigue, and inflammation in cancer. *Current Psychiatry Reports*, *17*(3), 555. <https://doi.org/10.1007/s11920-015-0555-3>
- Li, J. Y., Tao, F., Wu, X. X., Tan, Y. Z., He, L., & Lu, H. (2015). Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes contribute to the development of type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population. *Genetics and Molecular Research*, *14*, 12993–13002. <https://doi.org/10.4238/2015.October.21.20>
- Liu, Z., Ren, Z., Zhang, J., Chuang, C. C., Kandaswamy, E., Zhou, T., & Zuo, L. (2018). Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Frontiers in Physiology*, *9*, 477. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00477>
- Lopresti, A. L., Maker, G. L., Hood, S. D., & Drummond, P. D. (2014). A review of peripheral biomarkers in major depression: The potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *48*, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.09.017>
- Maes, M., Galecki, P., Chang, Y. S., & Berk, M. (2011). A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*, 676–692. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.05.004>
- Maes, M., Landucci Bonifacio, K., Morelli, N. R., Vargas, H. O., Barbosa, D. S., Carvalho, A. F., & Nunes, S. O. V. (2019). Major differences in neurooxidative and neuronitrosative stress pathways between major depressive disorder and types I and II bipolar disorder. *Molecular Neurobiology*, *56*, 141–156. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1051-7>
- Michel, T. M., Frangou, S., Thiemeyer, D., Camara, S., Jecel, J., Nara, K., ... Riederer, P. (2007). Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder—a postmortem study. *Psychiatry Research*, *151*, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2006.04.013>
- Möllsten, A., Jorsal, A., Lajer, M., Vionnet, N., & Tarnow, L. (2009). The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Diabetologia*, *52*, 2590–2593. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1550-1>
- Montano, M. A. E., Barrio Lera, J. P., Gottlieb, M. G. V., Schwanke, C. H. A., da Rocha, M. I. U. M., Manica-Cattani, M. F., ... da Cruz, I. B. M. (2009). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *328*, 33–40. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0071-z>

- Montano, M. A., da Cruz, I. B., Duarte, M. M., Krewer Cda, C., da Rocha, M. I., Mânica-Cattani, M. F., ... Lera, J. P. (2012). Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, *60*(1), 30–33. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.05.022>
- Nasca, C., Davis, E., Bigio, B., Sandi, C., & McEwen, B. S. (2017). Effects of stress throughout the lifespan on the brain and behavior. In *Hormones, brain and behavior*, 3rd edn. (pp. 443–463). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00111-5>
- Niraula, A., Sheridan, J. F., & Godbout, J. P. (2017). Microglia priming with aging and stress. *Neuropsychopharmacology*, *42*(1), 318–333. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.185>
- Pae, C.-U., Yoon, S.-J., Patkar, A., Kim, J.-J., Jun, T.-Y., Lee, C., & Paik, I.-H. (2006). Manganese superoxide dismutase (MnSOD: Ala-9Val) gene polymorphism and mood disorders: A preliminary study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *30*, 1326–1329. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.03.009>
- Parra, F. C., Amado, R. C., Lambertucci, J. R., Rocha, J., Antunes, C. M., & Pena, S. D. J. (2003). Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*, 177–182. <https://doi.org/10.1073/pnas.0126614100>
- Pascotini, M. E. T., Flores, D. A. E., Kegler, M. A., Konzen, M. V., Fornari, M. A. L., Arend, M. J., ... Figuera, D. M. R. (2018). Brain-derived neurotrophic factor levels are lower in chronic stroke patients: A relation with manganese-dependent superoxide dismutase ALA16VAL single nucleotide polymorphism through tumor necrosis factor- α and caspases pathways. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, *27*, 3020–3029. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.06.032>
- Picca, A., Lezza, A. M. S., Leeuwenburgh, C., Pesce, V., Calvani, R., Bossola, M., ... Marzetti, E. (2018). Circulating mitochondrial DNA at the crossroads of mitochondrial dysfunction and Inflammation During Aging and Muscle Wasting Disorders. *Rejuvenation Research*, *21*(4), 350–359. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1989>
- Pietras, T., Witusik, A., Panek, M., Galecki, P., Szemraj, J., & Górski, P. (2010). Anxiety, depression and polymorphism of the gene encoding superoxide dismutase in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Polski Merkuriusz Lekarski*, *29*, 165–168.
- Pocklington, C., Gilbody, S., Manea, L., & McMillan, D. (2016). The diagnostic accuracy of brief versions of the Geriatric Depression Scale: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, *31*, 837–857. <https://doi.org/10.1002/gps.4407>
- Pourvali, K., Abbasi, M., & Mottaghi, A. (2016). Role of superoxide dismutase 2 gene ala16Val polymorphism and total antioxidant capacity in diabetes and its complications. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, *8*(2), 48–56.
- Prenderville, J. A., Kennedy, P. J., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Adding fuel to the fire: The impact of stress on the ageing brain. *Trends in Neurosciences*, *38*, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.11.001>
- Rizvi, S., Raza, S. T., & Mahdi, F. (2014). Association of genetic variants with diabetic nephropathy. *World Journal of Diabetes*, *5*, 809–816. <https://doi.org/10.4239/wjcd.v5.i6.809>
- Seo, J.-S., Park, J.-Y., Choi, J., Kim, T.-K., Shin, J.-H., Lee, J.-K., & Han, P.-L. (2012). NADPH oxidase mediates depressive behavior induced by chronic stress in mice. *Journal of Neuroscience*, *32*, 9690–9699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0794-12.2012>
- Siegrist, J., & Sies, H. (2017). Disturbed redox homeostasis in oxidative distress: A molecular link from chronic psychosocial work stress to coronary heart disease? *Circulation Research*, *121*(2), 103–105. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311182>
- Souiden, Y., Mallouli, H., Meskhi, S., Chaabouni, Y., Rebai, A., Chéour, F., & Mahdouani, K. (2016). MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. *Biological Research*, *49*, 22. <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0083-6>
- Straub, R. H., & Cutolo, M. (2018). Psychoneuroimmunology-developments in stress research. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, *168*(3–4), 76–84. <https://doi.org/10.1007/s10354-017-0574-2>
- Sugishita, K., Sugishita, M., Hemmi, I., Asada, T., & Tanigawa, T. (2017). A validity and reliability study of the Japanese version of the geriatric depression scale 15 (GDS-15-J). *Clinical Gerontologist*, *40*, 233–240. <https://doi.org/10.1080/07317115.2016.1199452>
- Tagliari, B., Noschang, C. G., Ferreira, A. G., Ferrari, O. A., Feksa, L. R., Wannmacher, C. M., ... Wyse, A. T. (2010). Chronic variable stress impairs energy metabolism in prefrontal cortex and hippocampus of rats: Prevention by chronic antioxidant treatment. *Metabolic Brain Disease*, *25*(2), 169–176. <https://doi.org/10.1007/s11011-010-9194-x>
- Uchihara, Y., Tanaka, K.-I., Asano, T., Tamura, F., & Mizushima, T. (2016). Superoxide dismutase overexpression protects against glucocorticoid-induced depressive-like behavioral phenotypes in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *469*, 873–877. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.085>
- Valvassori, S. S., Bavaresco, D. V., Feier, G., Cechinel-Recco, K., Steckert, A. V., Varela, R. B., ... Quevedo, J. (2018). Increased oxidative stress in the mitochondria isolated from lymphocytes of bipolar disorder patients during depressive episodes. *Psychiatry Research*, *264*, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.03.089>
- Wada, K., Sairenchi, T., Haruyama, Y., Taneichi, H., Ishikawa, Y., & Muto, T. (2013). Relationship between the onset of depression and stress response measured by the Brief Job Stress Questionnaire among Japanese employees: A cohort study. *PLoS ONE*, *8*, e56319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056319>
- Wang, P. S., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J., Angermeyer, M. C., Borges, G., Bromet, E. J., ... Wells, J. E. (2007). Worldwide use of mental health services for anxiety, mood, and substance disorders: Results from 17 Countries in the WHO world mental health (WMH) surveys. *Lancet*, *370*(9590), 841–850. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61414-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61414-7)
- Wei, Y.-C., Zhou, F.-L., He, D.-L., Bai, J.-R., Ding, H., Wang, X.-Y., & Nan, K.-J. (2009). Oxidative stress in depressive patients with gastric adenocarcinoma. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *12*, 1089–1096. <https://doi.org/10.1017/S1461145709000091>
- Wigner, P., Czarny, P., Synowiec, E., Bijak, M., Biatek, K., Talarowska, M., ... Sliwinski, T. (2018). Variation of genes involved in oxidative and nitrosative stresses in depression. *European Psychiatry*, *48*, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2017.10.012>
- World Health Organization. (2015). Sixty-fifth world health assembly 2015. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/events/2012/wha65/journal/en/index4.html>. Accessed on October 10, 2017.
- Xie, X., Chen, Y., Ma, L., Shen, Q., Huang, L., Zhao, B., ... Fu, Z. (2017). Major depressive disorder mediates accelerated aging in rats subjected to chronic mild stress. *Behavioral Brain Research*, *329*, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.022>
- Yesavage, J. A., Brink, T. L., Rose, T. L., Lum, O., Huang, V., Adey, M., & Leirer, V. O. (1982). Development and

- validation of a geriatric depression screening scale: A preliminary report. *Journal of Psychiatric Research*, *17*, 37–49. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(82\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0022-3956(82)90033-4)
- Zeng, M. Y., Miralda, I., Armstrong, C. L., Uriarte, S. M., & Bagaikar, J. (2019). The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Molecular Oral Microbiology*, *34*, 27–38. <https://doi.org/10.1111/omi.12252>
- Zhang, Y., Chen, Y., & Ma, L. (2018). Depression and cardiovascular disease in elderly: Current understanding. *Journal of Clinical Neuroscience*, *47*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.joenv.2017.09.022>
- Zuccarella-Hackl, C., von Känel, R., Thomas, L., Kuebler, P., Schmid, J.-P., Mattle, H. P., ... Wirtz, P. H. (2016). Higher macrophage superoxide anion production in coronary artery disease (CAD) patients with Type D personality. *Psychoneuroendocrinology*, *68*, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.02.031>

How to cite this article: da Cruz Jung IE, da Cruz IBM, Barbisan F, et al. Superoxide imbalance triggered by Val16Ala-SOD2 polymorphism increases the risk of depression and self-reported psychological stress in free-living elderly people. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;00:e1080. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1080>

Val16Ala-SOD2 polymorphism modulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis molecules and BDNF levels in healthy adults under no psychological stress

I.E. da Cruz Jung^{1,2}, T. Duarte², I.B.M. da Cruz^{1,2}, B.O. Turra^{1,2},
B. Chitolina², J.R. Motta⁴, M.A.E. Montano³, V.F. Azzolin⁴,
E.E. Ribeiro⁵, M.M.M.F. Duarte^{1,6} and F. Barbisan^{1,2,4}

¹ Programa de Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

² Laboratório de Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

³ Universidade do Oeste de Santa Catarina, Xanxerê, SC, Brasil

⁴ Programa de Graduação em Gerantologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

⁵ Fundação da Universidade de Terceira Idade do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

⁶ Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brasil

Corresponding author: F. Barbisan
E-mail: fernandabarbisan@gmail.com

Genet. Mol. Res. 19 (2): gmr18586
Received January 16, 2019
Accepted March 31, 2020
Published May 27, 2020
DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr18586>

ABSTRACT. Chronic psychological stress alters the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA-axis), triggering chronic oxidative-inflammatory states that are associated with physical and psychiatric conditions. However, it is not clear if basal oxidative-inflammatory states triggered by genetic variation affect the HPA-axis by altering cortisol, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) levels. Humans have a single nucleotide polymorphism (SNP) found in manganese-dependent superoxide dismutase (Val16Ala-SOD2, rs4880), which has two alleles (V and A) which affect the basal efficacy of SOD2 antioxidant enzyme in the mitochondria. The VV-genotype, which

presents low SOD2-efficacy, has been associated with chronic inflammatory states, as well as higher risk of depression and self-reported psychological stress. Therefore, basal oxidative imbalance could have some influence on modulation of HPA-axis physiology. We tested this hypothesis comparing morning blood levels of cortisol, ACTH and DHEA-S and other biochemical markers in 90 healthy adult university students previously genotyped for the SOD2-SNP (30 volunteers for each genotype, 26.5 ± 8.7 years old). Only volunteers who self-reported no perception of psychological stress were included in the study. The VV group had higher morning cortisol and ACTH, and lower DHEA-S and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) than A-allele subjects. These results indicate some influence of S-imbalance on modulation of this molecule. Therefore, we suggest that genetically controlled pro-oxidative and inflammatory states could modulate physiological markers for stress and neurogenesis.

Key words: Oxidative stress; Antioxidant enzyme; Psychiatric diseases; Adrenocorticotrophic hormone; Dehydroepiandrosterone sulphate

INTRODUCTION

Evidence from epidemiological and experimental studies have suggested that chronic stress of psychosocial origin causes alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis triggering pro-inflammatory and pro-oxidative states (Black et al., 2017). Consequently, the oxidative-inflammatory processes associated with psychological stress would constitute a risk for the development of somatic, psychiatric and other chronic non-transmissible diseases (Russell and Lightman, 2019). Previous evidence suggested that the association between psychological stress and chronic inflammation involves some cellular imbalances that increase the level of oxidative molecules and reduce the autophagy of cellular metabolic wastes producing dangerous and pro-inflammatory molecules (Feldman et al., 2015; Straub and Cutolo, 2016). However, an open question is whether intrinsic basal oxidative states could interfere in the modulation of HPA-molecules that are altered under psychological stress states, such as cortisol, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S).

A genetic superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance has been associated with a human single nucleotide polymorphism (SNP) found in the manganese-dependent superoxide dismutase (Val16Ala-SOD2, rs4880) gene. The SOD2-SNP has two alleles (A-Alanine and V – Valine) and produces three genotypes (VV, AA and AV), which change the basal efficacy of SOD2 antioxidant enzyme in the mitochondria. The homozygous genotypes have an S-HP imbalance that has been associated with risk for several non-transmissible chronic diseases (Bresciani et al., 2013 and 2015). Some evidence indicates that superoxide dismutases have an important role in vascular function and disease (Miao et al., 2009; Fukai et al., 2011), and low-efficiency of SOD2-enzyme could be a risk factor. This presumption is corroborated by epidemiological investigations suggesting that VV-carriers, who have higher basal S-levels than A-allele carriers, have a higher risk to develop

hypercholesterolemia (Duarte et al., 2010) and resistance to statin treatment (Duarte et al., 2016), obesity (Montano et al., 2009; Becer and Çırakoğlu, 2015), several diabetes *mellitus* type 2 complications (Huang et al., 2017; Yahya et al., 2019) and some cardiovascular diseases (Gottlieb et al., 2005; Fujimoto et al., 2010; Chen et al., 2012; Pascotini et al., 2015; Souiden et al., 2016; Flores et al., 2017). Moreover, there are some studies that suggest potential association between VV-genotype and mood disorders (Gałecki et al., 2010; Wigner et al., 2018; Jung et al., 2020).

On the other hand, AA-genotype has been associated with risk of DNA damage (Taufer et al., 2005), higher risk of developing sepsis states (Paludo et al., 2013; Majolo et al., 2015) and some cancer types, since the individual presents high basal HP-levels (Berto et al., 2015; Kang 2015; Li et al., 2016; Wang et al., 2018). A possible association between Val16Ala-SOD2-SNP and non-transmissible chronic diseases seems to involve a differential inflammatory response associated with homozygous VV and AA-genotypes: in the presence of a pro-inflammatory factor, VV-carriers have a high susceptibility to maintain low-grade chronic inflammatory states, whereas AA-carriers have a higher faster and shorter inflammatory response than V-allele carriers (Barbisan et al., 2017).

Therefore, one can infer that basal S-HP imbalance produced by Val16Ala-SOD2-SNP has some influence on modulation of HPA-axis's physiology. Considering that HPA-axis alterations have been consistently associated with depression and other mood disorders (Jurueña et al., 2018), we hypothesized that oxidative imbalance related to Val16Ala-SOD2 SNP could influence some HPA-axis molecules, such as ACTH and DHEA-S. In order to test this hypothesis, we compared the morning blood levels of these molecules in non-stressful and mental healthy adults.

MATERIAL AND METHODS

General study design and ethics

The present investigation is a part of a broader research project developed by Biogenomics Laboratory (Federal University of Santa Maria, Brazil) that studies the role of S-HP imbalance triggered by Val16Ala-SOD2 SNP on the risk of developing non-transmissible chronic diseases prevalent in elderly population and its potential pharmacogenetic, nutrigenetic and toxicogenetic effects. This has been also evaluated by *in vitro* genetic and/or pharmacological S-P imbalance protocols (Barbisan et al., 2014; Berto et al., 2015; Azzolin et al., 2016; Schott et al., 2017; Barbisan et al., 2018). Therefore, participants of this study were selected from an initial databank of 180 free-living community subjects (26.5 years old, minimum = 18; maximum = 40 years old). All subjects were previously Val16Ala-SOD2 SNP genotyped using isolated DNA samples and by standard polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques, a procedure similar to that used by Barbisan et al., 2014. Similar to the study previously performed by Jung et al (2020), volunteers were asked if they felt psychologically stressed. Only those who did not have any self-perceived psychological stress were include in the study.

From this sample, we selected a group to participate in the HPA-axis analysis; all of them were students at the Federal University of Santa Maria (Brazil) (≤ 40 years old). All subjects lived in the same region of Brazil (Rio Grande do Sul), were non-smokers, non-

obese, didn't have any previous, psychiatric or not, non-transmissible chronic diseases, especially obesity, hypercholesterolemia and diabetes *mellitus* type 2, identified by a structured interview that included evaluation of occurrence of daily medicine intake of psychotropics, dietary supplements and other drugs that could affect the HPA-axis modulation. Moreover, we excluded volunteers that self-reported living a chronically stressful time in their lives in the last six months. Therefore, 30 subjects of each genotype (n = 90) were selected to compose the sample investigated here. As most subjects included in the protocol were undergraduate and graduate students blood samples were not taken during periods of school exams, which could influence the modulation of the HPA axis.

All the study participants provided their written informed consent, and this protocol was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (CAE n° 23081.015838/2011-10). The study described here was also carried out in accordance to The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Laboratory analysis

The HPA-axis markers were quantified by a commercial clinical analysis laboratory (Labimed Company) located in Santa Maria-RS, Brazil. The pharmacists who performed the biochemical analyses did not know the genotype of the volunteers participating. In order to guarantee that subjects present similar physiological profile some biochemical variables were also evaluated and compared among samples including the quantification of: glucose, lipids (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides) determined by spectrophotometry assays, and high-sensitivity C reactive protein (hs-CRP) quantified by nephelometry (Dade Behring, Newark, DE, EUA) (Freitas et al., 2018). Inflammatory status was also evaluated by cell-free circulating DNA on plasma, quantified by PicoGreen assay (Quant-iT PicoGreen®, Invitrogen, Eugene, OR, USA) using a microplate reader (SpectraMax M2e, Molecular Devices, Austria) with fluorescence quantified at an excitation of 485 nm and an emission of 520 nm. The cfDNA levels indicate leukocytes apoptosis, event very common in infections and inflammatory states (Frank et al., 2016). The concentration of glucose, lipid prolife and hs-CRP are presented as mmol and cfDNA as pg/mL.

Considering that Pascotini et al. (2018) described the association between lower levels of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and VV-SOD2 genotype, this marker was also quantified in subjects studied here. BDNF is a neurotrophin of crucial relevance in the central nervous system to neural plasticity and network formation that presents inverse correlation with cortisol levels (Barfield and Gourley, 2018). BDNF levels were determined by an enzyme immunoassay (ELISA) using a commercial kit from eBIOSCIENCE (E-EL-H0010, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions. The detection range of the kit is 31.25-2000 pg/mL.

The levels of cortisol, ACTH and DHEA were also analyzed through enzyme immunoassay (ELISA) for determination of markers in human serum and/or plasma

using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Immuno Biological Laboratories, cortisol = RE52611, ACTH = RE53081, and DHEA = IB79342) (Freitas et al., 2018). Cortisol is the main glucocorticoid hormone in human beings and presents a circadian fluctuation achieving the highest level in the morning. Cortisol secretion by adrenal cortex is regulated by a negative feedback mechanism via Corticotropin releasing hormone (CRH) in the hypothalamic region and the ACTH in the pituitary gland. However, its secretion is also affected by different stress situations. Therefore, in the present study, free cortisol, ACTH and DHEA-S levels were measured from blood samples collected from 8am - 9am by venipuncture while the subjects were fasting. The blood aliquots were centrifuged at 4°C at $500 \times g$ for 15 min, sample aliquots were frozen at -80°C until their analysis. In the commercial kit used here analytical sensitivity (limit of detection) was BDNF= 18.75 pg/mL; cortisol = 0.005 µg/dL; ACTH= 1 pg/mL and DHEA-S = 0.002 µg/mL. We provided intra-assay and inter-assay coefficients of variation as follow: BDNF (5.39% and 4.21%), cortisol (5.9% and 13%); ACTH (7.6% and 7.1%) and DHEA-S (6.8% and 12.2%).

The general immunoassay quantification of BDNF and HPA-axis markers was performed as follow: 50 µL of each standard, control and sample was pipetted into respective wells of microtiter plate. Further, 100 µL enzyme conjugate was added into each well, the plate was covered with adhesive foil, shaken carefully and incubate for 2 h at room temperature (RT) on an orbital shaker (400-600 rpm). After adhesive foil removal and removal and disposal of the incubation solution, the plate was washed 4 x with 250 µL of diluted Wash Buffer. Each time, the excess solution was removed by tapping the inverted plate on a paper towel. TMB substrate solution (100 µL) was added to each well and incubated for 30 min. Finally, 100 µL of the stop solution was added to each well and the optical density was determined within 30 min using a microplate reader set to 450 nm. The concentrations of BDNF and ACTH were presented as pg/mL, cortisol as µg/mL and DHEA-S as ng/mL.

Statistical Analyses

Data analysis was performed with SPSS (version 22.0.1; SPSS Inc., Chicago, IL). Quantitative variables without normal distribution determined by Kolmogorov-Smirnov test were log-transformed before comparison among SOD2-genotypes. These variables were compared among genotypes by analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test or by Student *t test*, when dose-allele effect was analyzed. Categorical variables were compared by chi-square test or Fisher Exact test. General Pearson correlation between HPA-axis markers were also performed. The alpha value considered was set at 0.05, and all P values were two-tailed. Multivariate logistic regression analysis (Backward Wald) was performed in order to determine some sex, age and education level influence on association between Val16Ala-SOD2 SNP and HPA-axis and other biochemical markers evaluated here. All statistical analysis with $P \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Among the 90 subjects included in the study, 43% were male and 57% female. Most subjects had >12 years of school education (74%). Table 1 presents some biochemical characteristics baselines with total sample independent of Val16Ala-SOD2 SNP. The levels of metabolic variables, such as glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides, as well as hs-CRP were similar among subjects carrying different SOD2 genotypes. However, BDNF levels were dose-allele influenced ($P = 0.001$), with higher values found in AA-subjects (30.29 ± 5.64 pg/mL), intermediary values in AV-subjects (22.02 ± 3.69 pg/mL) and lower values in VV-subjects (14.20 ± 2.54 pg/mL).

Table 1. Baseline biochemical characteristics of healthy adults not under psycho-emotional stress enrolled in the study.

Variables	Subjects (n= 90)
BMI (Kg/m^2)	24.9 ± 3.4
Glucose (mmol/L)	4.16 ± 0.07
Total cholesterol (mmol/L)	3.76 ± 0.07
LDL-cholesterol (mmol/L)	1.86 ± 0.04
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.31 ± 0.05
Tryglicerides (mmol/L)	1.03 ± 0.07
hs-CRP (mg/L)	0.22 ± 0.03
BDNF (pg/mL)	22.26 ± 7.57
Cortisol (ng/mL)	11.48 ± 4.61
ACTH (pg/mL)	6.77 ± 3.32
DHEA-S (ng/mL)	5.86 ± 2.07

BMI – body mass index; LDL– low density lipoproteins; HDL- high density lipoproteins; hs-CRP = High-sensitivity c-reactive protein; BDNF= Brain-derived neurotrophic factor; ACTH = Adrenocorticotrophic hormone; DHEA-S = dehydroepiandrosterone sulfate

The SNP also affected significantly ($P = 0.0001$) the levels of three HPA-axis markers analyzed here (Figure 1). VV-subjects presented higher levels of cortisol and ACTH and lower levels of DHEA-S than AA-subjects. On the other hand, heterozygotes had intermediary values of these markers, when compared to homozygous subjects. However, additional multivariate analysis did not find influence of sex and age in these results.

As expected, a significant and positive correlation between cortisol and ACTH morning-blood levels was found in the subjects analyzed in this investigation ($r^2 = 0.745$, $P < 0.001$). On the other hand, cortisol presented a significant negative correlation with DHEA-S levels ($r^2 = - 0.566$, $P < 0.001$). ACTH was also negatively correlated with DHEA-S levels ($r^2 = - 0.519$, $P < 0.001$).

Potential correlation between BDNF and HPA-axis values was evaluated, and main results are presented in the Figure 2. Negative correlation between BDNF and cortisol and BDNF and ACTH levels was observed in all subjects analyzed here. A significant positive correlation between BDNF and DHEA morning-blood levels was also observed in the young healthy subjects investigated here. However, Val16Ala-SOD2 SNP did not influence the correlation between BDNF and HPA-axis markers.

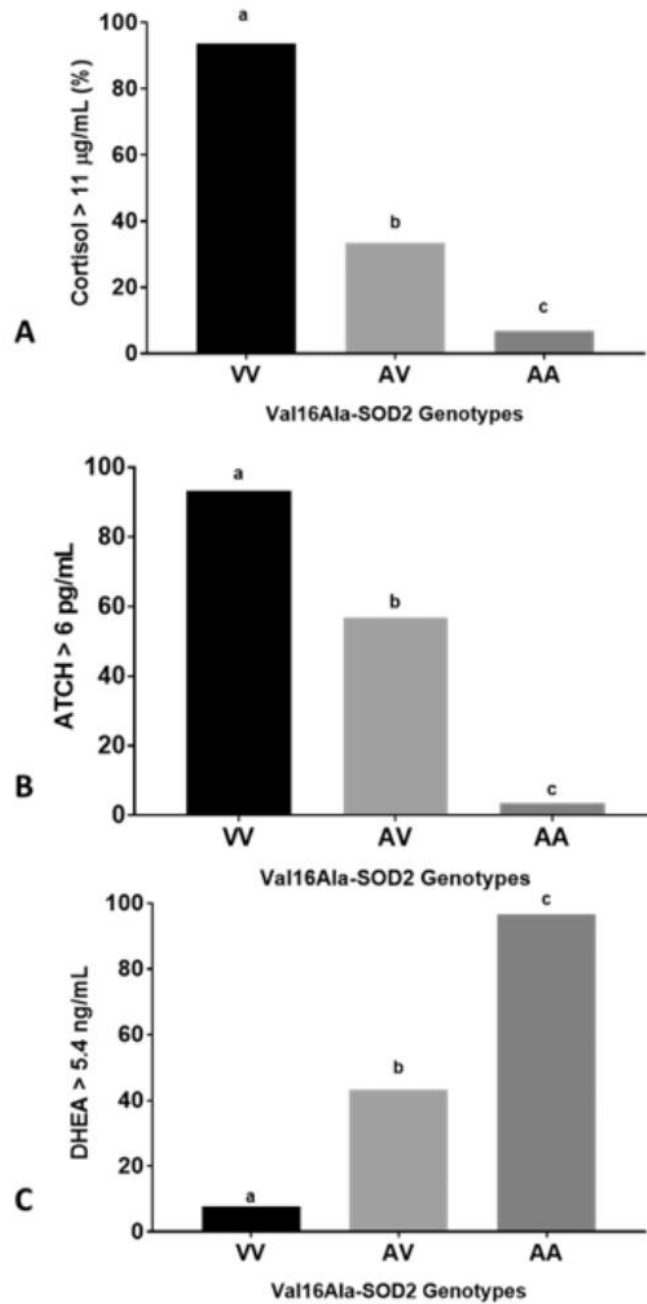


Figure 1. Comparison of fasting morning-blood cortisol, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) levels among healthy adult subjects carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes (Valine-Valine, VV; Alanine-Alanine, AA and Alanine-Valine, AV) by One-way analysis of variance followed by Bonferroni *post hoc* test. Different letters indicate significant differences among genotypes at $P \leq 0.01$.

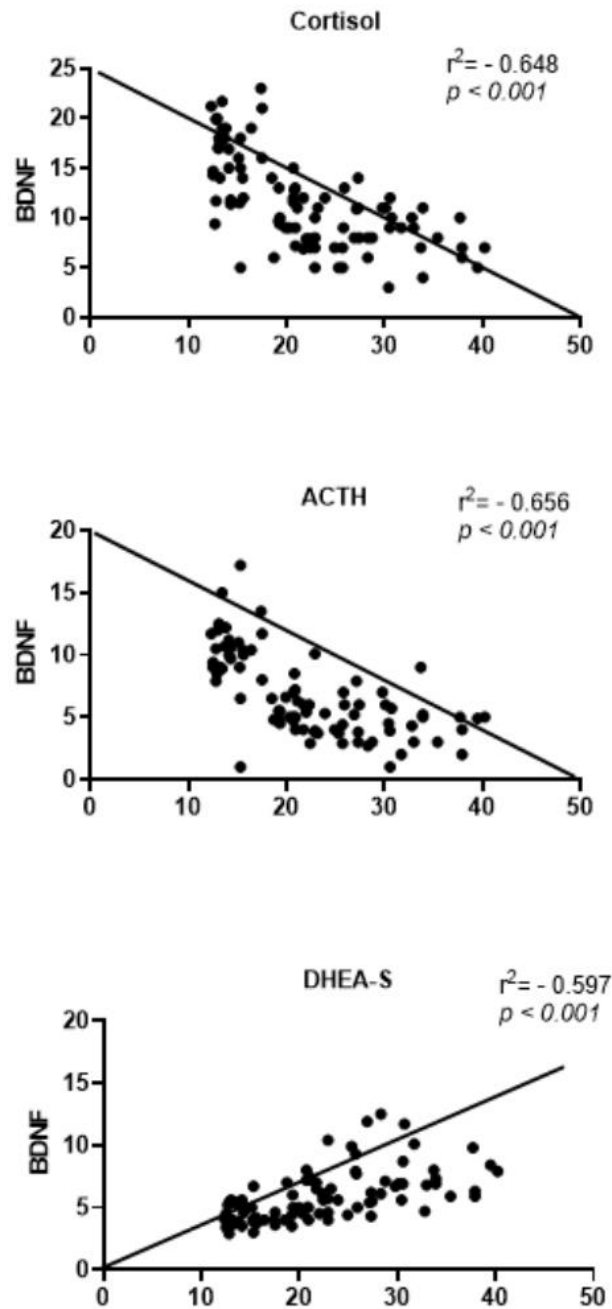


Figure 2. General Pearson correlation between Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis molecules (independent of Val16Ala-SOD2 genotypes) in fasting morning blood in healthy adult subjects. Correlation (r^2) and significance (P) are shown in each graph.

DISCUSSION

We evaluated if intrinsic basal S-HP imbalance caused by a genetic variation found in the SOD2 gene could differentially modulate HPA-axis molecules. The VV-subjects that have higher S-basal levels than A-allele subjects presented higher levels of stress-related molecules (cortisol and ACTH) and lower levels of DHEA-S. However, the correlation between these molecules was not affected by SOD2 SNP. Moreover, VV-subjects presented lower morning-blood BDNF levels than others indicating some influence of S-imbalance on modulation of this molecule. From these results, we consider relevant to discuss three main points: potential influence of S-HP imbalance on HPA-axis modulation; potential influence of S-HP imbalance on BDNF levels and finally methodological constrains that could present some influence on results described here.

It is well accepted that psychological stress in life is unavoidable. However, persistent psychological stress can lead to the development of anxiety, depression, and cognitive impairment, and contribute to a higher risk for chronic non-transmissible diseases (Adam et al., 2017). In fact, chronic psychological stress can result in sympathetically mediated negative effects that alter UTC mitochondrial function, increasing the levels of ROS molecules (Picard et al., 2015). Moreover, there are many evidences that suggest that neurodegenerative and neuropsychiatric disorders are closely related to excess of oxidative stress that alters SNC functions (Wadhwa et al., 2018).

However, studies investigating whether basal states of oxidative imbalance could affect HPA axis modulation are still incipient. The present study sought to contribute to the elucidation of this question through the analysis of the basal levels of cortisol, ACTH and DHEA-S in individuals carrying different Val16Ala-SOD2 genotypes. The potential effect of VV-genotype on HPA-axis modulation could be plausible based in the increase of S-levels into mitochondria. In order to understand this association is necessary to comment some aspects related to S-basal imbalance triggered by Val16Ala-SOD2 SNP, that is summarized in the Figure 3. The SOD2-enzyme is synthesized from a nuclear gene located in chromosome 6 at the 25.3 position.

From SOD-2 mRNA, an inactive SOD2-protein is initially produced, which contains a peptide sequence named mitochondrial target sequence (MTS) that is crucial for the entry of the enzyme into the mitochondria. By the time SOD2 enters the mitochondria the MST sequence is lost, and the enzyme becomes active. S-anion is the primary ROS generated by mitochondrial electron transport chain (ETC) (Figure 3A).

The passage of electrons through ETC generates energy; and ultimately these electrons reduce molecular oxygen in to water. This process involves a series of redox carriers known as Complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase), complex II (succinate dehydrogenase), complex III (ubiquinol-cytochrome c reductase) and complex IV (cytochrome c oxidase). The exergonic process of electron transport through complex I–IV will be the last step related to adenosine triphosphate (ATP) generation. However, this process is not 100% efficient occurring the exit of some electrons from the ETC before they get reduced to water at Complex IV. This exit is named “electron leak”, that is the major causative factor for production of mitochondrial S-anion, mainly in Complexes I and IV. Therefore, SOD2-enzyme has a crucial role in the mitochondria avoiding detrimental S-anion action, that can react with nitric oxide (NO) producing peroxynitrite and other ROS molecules (Sutton et al., 2003; Murphy 2009; Rich and Marechal 2010).

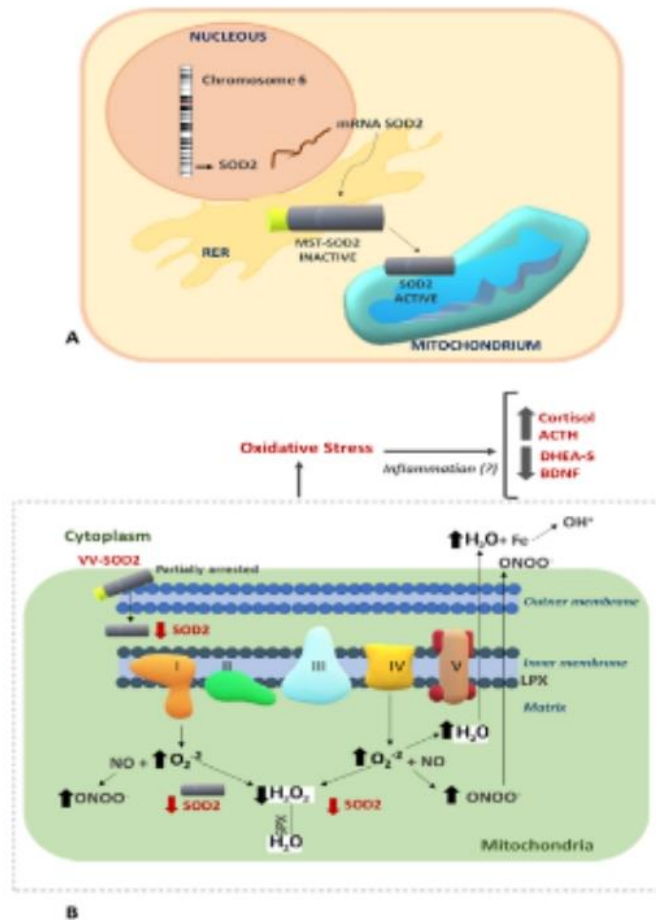


Figure 3. General scheme of superoxide dismutase manganese dependent (SOD2) metabolism and the potential Val16Ala-SOD2 SNP effect on superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance related to VV-genotype on production of reactive oxygen and nitrosative molecules. (A) SOD2-gene is located in chromosome 6. Initially a SOD2-inactive protein is synthesized that has a peptide sequence named “mitochondrial sequence target, MTS” (represented in yellow) that triggers the protein into the mitochondria. In this organelle, MTS is cleaved and SOD2 becomes an active enzyme catalyzing S-anions that are constantly produced by mitochondrial electron transport chain; (B) V-allele produces a beta-sheet SOD2-protein that is partially arrested in outer mitochondrial membrane. A lower production of SOD2-active enzyme is not completely efficient to catalyze S-anion in H_2O_2 . Basal S-imbalance contributes to generates other oxidative and nitrosative molecules increasing the risk of oxidative stress and chronic low-grade inflammatory states. ACTH - adrenocorticotrophic hormone; DHEA-S = dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S); BDNF = Brain-derived neurotrophic factor.

The Val16Ala-SOD2 SNP interferes in the SOD2-enzyme efficiency because it induces alterations in the conformation of SOD2-inactive protein. Whereas V-allele produce a beta-sheet SOD2-inactive protein, A-allele produce an alpha-helix SOD2-inactive protein. The VV-SOD2 conformation induces a partial arrest of inactive protein in outer mitochondrial membrane. In consequence, VV-mitochondria has lower levels of SOD2-enzyme than A-allele mitochondria determining low-efficiency in the catalysis of S-anion in HP-molecules (Figure 3B) (Sutton et al., 2003). Previous studies have suggested that VV-imbalance could contribute to establishment of chronic low-grade inflammation processes

that are observed in several non-transmissible chronic diseases, such as hypercholesterolemia, diabetes *mellitus* type 2 and cardiovascular morbidities (Bresciani et al., 2015). Moreover, some *in vitro* and *in vivo* protocols have suggested potential pharmacogenetic effects of Val16Ala-SOD2 SNP (Costa et al., 2012; Duarte et al., 2016).

Considering potential SOD2-SNP on mental health, previous studies have suggested that VV-genotype could increase the risk of depression, which is a psychiatric condition closely associated with psychological stress (Galecki et al., 2010; Wigner et al., 2018; Jung et al., 2020). However, although the SOD2-polymorphism affected morning-blood levels of cortisol, ACTH and DHEA, the correlation between these molecules was altered indicating that the S-imbalance induced by VV-genotype does not act on the feedback mechanism of HPA-axis.

Another relevant result described here is in respect to the association between SOD2-SNP and BDNF levels since VV-subjects presented lower levels of this important neurotrophic molecule, confirming a previous report performed by Pascotini et al. (2018). A complementary analysis was performed to determine potential influence of SOD2 SNP on correlation between BDNF and HPA-axis molecules. In fact, expression and secretion of neurotrophines, such as BDNF are modulated by neuronal activity that is directly influenced by light and dark periods. As BDNF is also influenced by circadian period, some studies (Begliuomini et al., 2008; Pluchino et al., 2009) showed that BDNF and cortisol levels are significantly higher in the morning than at night in healthy men subjects. Experiments in rats and mice also demonstrated the involvement and relevance of BDNF in basal HPA-axis regulation (Naert et al., 2015).

However, elevated levels of cortisol due to stressful experiences have deleterious effects on neuroplasticity (McEwen et al., 2008). Previous studies described an inverse correlation between cortisol and BDNF levels in some psychiatric conditions including schizophrenia (Issa et al., 2010), female suicide attempters (Ambrus et al., 2016) and depression (Malhi et al., 2018). Elevated cortisol levels during a lifetime is a predictor of human hippocampal atrophy related to cognitive deficits found in depressive patients (Lupien et al., 1998). On the other hand, genetic studies involving a Val66Met SNP in the BDNF gene have described an association with this SNP on cortisol responses to stress in women (Jiang et al., 2017). Some experimental studies also suggested that reduced DHEA and BDNF levels could be involved in the pathophysiology and pharmacotherapy of childhood depression (Malkesman et al., 2009). In other studies, there are some evidences showing lower cortisol and BDNF levels in child and adolescent victims of sexual abuse (Şimşek et al., 2015).

Thus, it seems that the modulatory association of BDNF and the HPA-axis could be altered in the presence of some physiological and neuropsychiatric states and by genetic influence, as is the case of the polymorphism in the previously mentioned BDNF gene. However, results described in this study also appear to show that the basal oxidative state would influence the modulation of BDNF and HPA-axis.

Some investigations, such as performed by Mansur et al. (2016) also indicate that BDNF has a positive correlation with SOD activity, acting as a regulatory molecule on SOD2 gene expression of circulating angiogenic cells (He et al., 2012). Therefore, the higher susceptibility of VV- subjects presenting high levels of cortisol and ACTH and reduced levels of BDNF is in agreement with previous studies published in the literature, such as conducted by Bouvier et al., 2017. These authors observed that intense social defeat

stress produced vulnerability to depression in rats, and that depression was a consequence of a persistent oxidative stress state and lower BDNF-levels. They also indicated that treatments with antioxidants were able to reverse this vulnerability.

In another experimental investigation performed by Freitas et al. (2018), high intensity interval training (HIIT) induced elevation of hippocampal BDNF levels, and reduction of oxidative stress by elevation of SOD enzyme in young adult, male Wistar rats. The experiment also showed decreasing proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) in these rats. This also demonstrates the close modulation of psychological stress via HPA-axis and BDNF alterations, oxidative stress and inflammatory states.

Previous studies have suggested that VV-SOD2 genotype is associated with high basal S-levels, chronic inflammatory states including elevated levels of pro-inflammatory cytokines (Montano et al., 2012; Barbisan et al., 2017) and risk of some cardiometabolic morbidities and depression (Galecki et al., 2010; Flores et al., 2017). In these terms, the main novelty of the results described here lies in the fact that independent of psychological chronic stress occurrence, individuals carrying the VV genotype have a “pro-stress condition” potentially determined by higher levels of cortisol and ACTH and lower levels of DHEA-S and BDNF. Perhaps this “pro-stress condition” could explain an elevated risk of VV-subjects to develop depression. How much preventive actions could minimize this potential susceptibility to the existent stress in VV individuals, through a diet rich in antioxidants and moderate physical activity, is a question to be investigated better in the future.

Finally, it is important to comment some methodological constraints of our study. A consistent number of studies investigate HPA axis modulation through analysis of cortisol, ACTH and DHEA-S levels of saliva or blood samples collected at different times of the day. However, in these cases it is quite difficult to control if the subjects of the research ended up being exposed to some level of acute stress, which could mask the results. Actually, it is not easy to establish association studies involving genetic of oxidative metabolism, since there are several potential intervenient factors that could act as attenuators or enhancers of oxidative stress associated to psychological stress and psychiatric disorders. For this reason, we opted to investigate the morning levels of cortisol, ACTH and DHEA-S in a high and controlled sample of healthy subjects previously SOD2-genotyped.

CONCLUSIONS

In summary, we suggest that HP imbalance determined by Val16Gln-SOD2 SNP modulates physiological markers for stress and neurogenesis. Further experimental *in vitro* and *in vivo* investigations could help confirm these findings. Based on our observations and review of the literature, this is a new finding that could have clinical impact.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the support of Coordenação de Apoio de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) for our grants (process numbers: 302661/2016-6; 400816/2016-4) and fellowships.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Adam EK, Quinn ME, Tavemier R, McQuillan MT, et al. (2017). Diurnal cortisol slopes mental and physical health outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 83: 25-41.
- Ambrus L, Lindqvist D, Träskman-Bendz L and Westrin Å (2016). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity is associated with decreased brain-derived neurotrophic factor in female suicide attempters. *Nord. J. Psychiatry*. 70(8): 575-581.
- Azzolin VF, Cadoná FC, Machado AK, Berto MD, et al. (2016). Superoxide-hydrogen peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and oxaliplatin response. *Toxicol In Vitro*. 32: 8-15.
- Barbisan F, Azzolin VF, Ribeiro EE, Duarte MMF, et al. (2017). The In Vitro Influence of a Genetic Superoxide-Hydrogen Peroxide Imbalance on Immunosenescence. *Rejuvenation Res*. 20(4): 334-345.
- Barbisan F, Azzolin VF, Monteiro GC, Teixeira CF, et al. (2018). Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen modulate the in vitro effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 β . *Gene*. 655: 48-55.
- Barbisan F, Motta JR, Trott A, Azzolin V, et al. (2014). Methotrexate-related response on human peripheral blood mononuclear cells may be modulated by the Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *PLoS One*. 9(10): e107299.
- Barfield ET and Gourley SL (2018). Prefrontal cortical trkB, glucocorticoids, and their interactions in stress and developmental contexts. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 95: 535-558.
- Becer E and Çirakoğlu A (2015). Association of the Ala16Val MnSOD gene polymorphism with plasma leptin levels and oxidative stress biomarkers in obese patients. *Gene*. 568(1): 35-39.
- Begliuomini S, Lenzi E, Ninni F, Casarosa E, et al. (2008). Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. *J. Endocrinol*. 97(2): 429-435.
- Berto MD, Bica CG, de Sá GP, Barbisan F, et al. (2015). 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.
- Black CN, Bot M, Révész D, Scheffer PG, et al. (2017). The association between three major physiological stress systems and oxidative DNA and lipid damage. *Psychoneuroendocrinology*. 80: 56-66.
- Bouvier E, Brouillard F, Molet J, Claverie D, et al. (2017). Nrf2-dependent persistent oxidative stress results in stress-induced vulnerability to depression. *Mol. Psychiatry*. 22(12): 1701-1713.
- Bresciani G, González-Gallego J, da Cruz IB, de Paz JA, et al. (2013). The Ala16Val MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise. *Clin. Biochem*. 46(4-5): 335-340.
- Bresciani G, da Cruz IB and González-Gallego J (2015). Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv. Clin. Chem*. 68: 87-130.
- Chen H, Yu M, Li M, Zhao R, et al. (2012). 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*. 363(1-2): 85-91.
- Costa F, Domelles E, Mânica-Cattani MF, et al. (2012) Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod Biomed Online*. 24(4): 474-481.
- Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, Santi A, et al. (2010). Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin. Biochem*. 43(13-14): 1118-1123.
- Duarte T, da Cruz IB, Barbisan F, Capelletto D, et al. (2016). 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.
- Feldman N, Rotter-Maskowitz A and Okun E (2015). DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res. Rev*. 24(Pt A): 29-39.
- Flores AE, Pascotini ET, Kegler A, Gabbi P, et al. (2017). ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: Association with dyslipidemia and glucose levels. *Gene*. 627: 57-62.
- Frank MO (2016). Circulating Cell-Free DNA Differentiates Severity of Inflammation. *Biol. Res. Nurs*. 18(5): 477-488.
- Freitas DA, Rocha-Vieira E, Soares BA, Nonato LF, et al. (2018). High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. *Physiol. Behav*. 184: 186-11.
- Fujimoto H, Kobayashi H, Ogasawara K, Yamakado H, et al. (2010). Association of the manganese superoxide dismutase polymorphism with vasospastic angina pectoris. *J. Cardiol*. 55(2): 205-210.
- Fukai T and Ushio-Fukai M (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 15(6): 1583-606.
- Galecki P, Smigielski J and Florkowski A (2010). Analysis of two polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene (Ile-58Thr and Ala-9Val) in patients with recurrent depressive disorder. *Psychiatry. Res*. 179(1): 43-46.

- Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, et al. (2005). Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet. Mol. Res.* 4: 691-703.
- He T, Katusic ZS (2012). Brain-derived neurotrophic factor increases expression of MnSOD in human circulating angiogenic cells. *Microvasc Res.* 83(3): 366-371. doi:10.1016/j.mvr.2012.01.001
- Huang L, Lyu J and Liu QP (2017). MnSOD Val16Ala polymorphism associated with retinopathy risk in diabetes: a PRISMA-compliant Meta-analysis of case-control studies. *Int. J. Ophthalmol.* 10(4): 639-645.
- Issa G, Wilson C and Terry AV Jr (2010). An inverse relationship between cortisol and BDNF levels in schizophrenia: data from human postmortem and animal studies. *Neurobiol. Dis.* 39(3): 327-333.
- Jiang R, Babyak MA, Brummett BH, Siegler IC, et al. (2017). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism interacts with gender to influence cortisol responses to mental stress. *Psychoneuroendocrinology.* 79: 13-19.
- Jung IE, da Cruz IBM, Barbisan F, Trott A, et al. (2020). Superoxide imbalance triggered by Val16Ala-SOD2 polymorphism increases the risk of depression and self-reported psychological stress in free-living elderly people. *Mol Genet Genomic Med.* 8(2): e1080.
- Juruena MF, Bocharova M, Agustini B and Nova AH (2018). Atypical depression and non-atypical depression: Is HPA axis function a biomarker? A systematic review. *J. Affect. Disord.* 233: 45-67.
- Kang SW (2015). Superoxide dismutase 2 gene and cancer risk: evidence from an updated meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8(9): 14647-14655.
- Li X, Shen M, Cai H, Liu K, et al. (2016). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis. *Int. J. Biol. Markers.* 31(4): e422-e430.
- Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, et al. (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neurosci.* 1(1): 69-73.
- Majolo F, Oliveira Paludo FJ, Ponzoni A, Graebin P, et al. (2015). Effect of 593C>T GPx1 SNP alone and in synergy with 47C>T SOD2 SNP on the outcome of critically ill patients. *Cytokine.* 71(2): 312-317.
- Malhi GS and Mann JJ (2018). Depression. *Lancet.* 392(10161): 2299-2312.
- Malkesman O, Asaf T, Shbiro L, Goldstein A, et al. (2009). Monoamines, BDNF, Dehydroepiandrosterone, DHEA-Sulfate, and Childhood Depression-An Animal Model Study. *Adv. Pharmacol. Sci.* 405:107.
- Mansur RB, Santos CM, Rizzo LB, Cunha GR, et al. (2016). Inter-relation between brain-derived neurotrophic factor and antioxidant enzymes in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 18(5): 433-439.
- McEwen BS (2008). Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur. J. Pharmacol.* 583: 174-185.
- Miao L and St Clair DK (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 47(4): 344-356.
- Montano MA, Barrio Lera JP, Gottlieb MG, Schwanke CH, et al. (2009). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol. Cell. Biochem.* 328(1-2): 33-40.
- Montano MA, da Cruz IB, Duarte MM, Krewer CC, et al. (2012). Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* 60(1): 30-33.
- Murphy MP (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417: 1-13.
- Naert G, Zussy C, Tran Van Ba C, Chevallier N, et al. (2015). Involvement of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *J. Neuroendocrinol.* 27(11): 850-860.
- Pascotini, ET, Flores AE, Kegler A, Gabbi P, et al. (2015). Apoptotic markers and DNA damage are related to late phase of stroke: Involvement of dyslipidemia and inflammation. *Physiol. Behav.* 151: 369-378.
- Pascotini ET, Flores AE, Kegler A, Konzen MV, et al. (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels are Lower in Chronic Stroke Patients: A Relation with Manganese-dependent Superoxide Dismutase ALA16VAL Single Nucleotide Polymorphism through Tumor Necrosis Factor- α and Caspases Pathways. *J. Stroke Cerebrovasc.* 27: 3020-3029.
- Paludo FJ, Picanço JB, Fallavena PR, Fraga LR, et al. (2013). Higher frequency of septic shock in septic patients with the 47C allele (rs4880) of the SOD2 gene. *Gene.* 517(1): 106-111.
- Picard M, McManus MJ, Gray JD, Nasca C, et al. (2015). Mitochondrial functions modulate neuroendocrine, metabolic, inflammatory, and transcriptional responses to acute psychological stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112(48): E6614-23.
- Pluchino N, Cubeddu A, Begliuomini S, Merlini S, et al. (2009). Daily variation of brain-derived neurotrophic factor and cortisol in women with normal menstrual cycles, undergoing oral contraception and in postmenopause. *Hum. Reprod.* 24(9): 2303-2309.
- Rich PR and Marechal A (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 47: 1-23.
- Russell G and Lightman S (2019). The human stress response. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15(9): 525-534.
- Schott KL, Assmann CE, Barbisan F, Azzolin VF, et al. (2017) Superoxide-hydrogen peroxide genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. *Chem. Biol.* 273: 18-27.

- Şimşek Ş, Yüksel T, Kaplan İ, Uysal C, et al. (2015). Examining the levels of BDNF and cortisol in children and adolescent victims of sexual abuse--a preliminary study. *Compr. Psychiatry*. 61: 23-27.
- Souiden Y, Mallouli H, Meskhi S, Chaabouni Y, et al. (2016). MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. *Biol. Res*. 49: 22.
- Straub RH and Cutolo M (2016). Glucocorticoids and chronic inflammation. *Rheumatology* 55: ii6-ii14.
- Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanec C, et al. (2003). The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 13(3): 145-157.
- Taufer M, Peres A, de Andrade VM, do Canto ME, et al. (2005). Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci*. 60(4): 432-8.
- Wadhwa R, Gupta R and Maurya PK (2018). Oxidative Stress and Accelerated Aging in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorder. *Curr. Pharm. Des*. 24(40): 4711-4725.
- Wang P, Zhu Y, Xi S, Li S, et al. (2018). Association between MnSOD Val16Ala Polymorphism and Cancer Risk: Evidence from 33,098 Cases and 37,831 Controls. *Dis. Markers*. 2018: 3061974.
- Wigner P, Czarny P, Synowiec E, Bijak M, et al. (2018). Variation of genes involved in oxidative and nitrosative stresses in depression. *Eur. Psychiatry*. 48: 38-48.
- Yahya MJ, Ismail PB, Nordin NB, Akim ABM, et al. (2019). CNDP1, NOS3, and MnSOD Polymorphisms as Risk Factors for Diabetic Nephropathy among Type 2 Diabetic Patients in Malaysia. *J. Nutr. Metab*. 3: 8736215.

Journal Pre-proof

Superoxide-anion triggers impairments of immune efficiency and stress response behaviors of *Eisenia fetida* earthworms

Ivo Emílio da Cruz Jung, Charles Elias Assmann, Moisés Henrique Mastella, Fernanda Barbisan, Ricardo Augusto Spilliaru Ruaro, Isabel Roggia, Bárbara Osmarin Turra, Bruna Chitolina, Audrei de Oliveira Alves, Cibele Ferreira Teixeira, Verônica Farina Azzolin, Euler Esteves Ribeiro, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Ivana Beatrice Mânica da Cruz



PII: S0045-6535(20)32910-6

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128712>

Reference: CHEM 128712

To appear in: *ECSN*

Received Date: 22 July 2020

Revised Date: 16 October 2020

Accepted Date: 19 October 2020

Please cite this article as: Emílio da Cruz Jung, I., Assmann, C.E., Mastella, M.H., Barbisan, F., Spilliaru Ruaro, R.A., Roggia, I., Turra, B.O., Chitolina, B., de Oliveira Alves, A., Teixeira, C.F., Azzolin, V.F., Ribeiro, E.E., Medeiros Frescura Duarte, M.M., Mânica da Cruz, I.B., Superoxide-anion triggers impairments of immune efficiency and stress response behaviors of *Eisenia fetida* earthworms, *Chemosphere*, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128712>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier Ltd.

Credit author statement

Ivo Emílio da Cruz Jung: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing, Writing - Review & Editing, Preparation. **Charles Elias Assmann:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing, Writing - Review & Editing, Preparation. **Moisés Henrique Mastella:** Methodology, Investigation, Visualization. **Fernanda Barbisan:** Conceptualization, Data Curation, Project administration Management and coordination responsibility. **Ricardo Augusto Spilliari Ruaro:** Methodology, Investigation, Writing. **Isabel Roggia:** Methodology, Investigation, Writing. **Bárbara Osmarin Turra:** Methodology, Investigation, Writing. **Bruna Chitolina:** Methodology, Investigation, Writing. **Audrei de Oliveira Alves:** Methodology, Investigation, Writing. **Cibele Ferreira Teixeira:** Methodology, Investigation, Writing. **Verônica Farina Azzolin:** Methodology, Investigation, Writing. **Euler Esteves Ribeiro:** Validation, Visualization, Preparation, Project administration Management and coordination responsibility. **Marta Maria Medeiros Frescura Duarte:** Validation, Visualization, Preparation, Project administration Management and coordination responsibility. **Ivana Beatrice Mânica da Cruz:** Term, Conceptualization, Formal analysis Application of statistical, Data Curation, Writing - Review & Editing, Supervision, Project administration Management and coordination responsibility, Funding acquisition.

Superoxide-anion triggers impairments of immune efficiency and stress response behaviors of *Eisenia fetida* earthworms

Running title: Oxidative imbalance in inflammation and stress responsiveness

Ivo Emílio da Cruz Jung^{a,#}, Charles Elias Assmann^{b,#}, Moisés Henrique Mastella^a, Fernanda Barbisan^{a,c,d}, Ricardo Augusto Spilliaru Ruaro^c, Isabel Roggia^{c,d}, Bárbara Osmarin Turra^a, Bruna Chitolina^c, Audrei de Oliveira Alves^a, Cibele Ferreira Teixeira^a, Verônica Farina Azzolin^{c,d}, Euler Esteves Ribeiro^e, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^a, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{a,c,d,*}

^a Graduate Program of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^b Graduate Program of Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

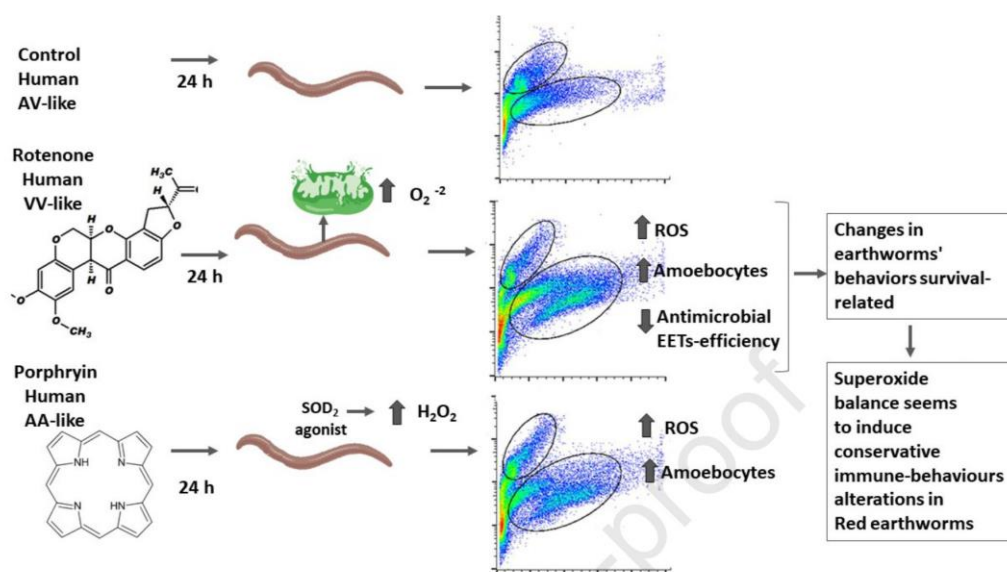
^c Biogenomics Lab, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^d Graduate Program of Gerontology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^e Open University of the Third Age Foundation - State University of Amazonas, Manaus, Brazil

[#] The first two authors contributed equally to this manuscript

* Corresponding author: Ivana BM da Cruz, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil. Zip Code: 97105900. Phone: +55 55 991199099. Email: ivana.ufsm@gmail.com



1 Abstract

2

3 Superoxide-hydrogen peroxide (S-HP), triggered by Val16Ala-SOD2 human
4 polymorphism, may influence the risk of depression. Therefore, it is plausible that
5 higher basal S-anion levels and chronic inflammatory states associated with the VV-
6 SOD2 genotype can negatively modulate the stress response associated with resilience
7 in various species, from primitive species to humans. To test this hypothesis, *Eisenia*
8 *fetida* earthworms were exposed for 24 h to 30 nM rotenone, which causes
9 mitochondrial dysfunction by generating high S-anion levels (known as the “VV-like
10 phenotype”), and 10 μ M porphyrin, a SOD2-like compound, which generates elevated
11 HP levels (known as the “AA-like phenotype”). The results suggested that both S-anion
12 and HP acted as signaling molecules, differentially altering the immune function and
13 acute hydric stressful response. Although the AA-like phenotype improved the immune
14 and stress response efficiencies, the VV-like phenotype showed a downregulated
15 expression of the *toll-like receptor* (*EaTLR*, *JX898685*) and *antimicrobial peptide*
16 (*AMP*) (*AF060552*) genes, which triggered the impairment of encapsulation and
17 earthworms extracellular trap (EET) processes used by earthworms to trap and destroy
18 microorganisms. When exposed to adverse environments and dangerous hydric stress,
19 VV-like earthworms exhibited an impulsive behavior and failed to quickly identify and
20 migrate to a protected environment, unlike control earthworms and AA-like
21 earthworms. All results corroborated that the S-anion imbalance could concomitantly
22 induce alterations in immune function and stress behavior related to earthworm
23 survival. From a human perspective, this information may corroborate the potential
24 specific role of superoxide anion in the modulation of the stress response, resilience,
25 and risk of depression.

26

27 **Keywords:** *Eisenia fetida*; Superoxide dismutase 2; Major depression; Inflammation;
28 *Toll-like receptor gene*; *antimicrobial peptide gene*.

29

30 **1. Introduction**

31 Chronic or severe acute emotional stress, which is a critical risk factor for the
32 development of major depression, has been associated with immune alterations,
33 including changes in the cellular composition of the blood and the functional activity of
34 immunocompetent cells, and low-grade inflammatory status (Kalinichenko et al., 2019).
35 This evidence supports the cytokine/inflammation hypothesis of depression based on
36 immune disturbance (Slavich and Irwin, 2014; Gałecki and Talarowska, 2018). One of
37 the contributing elements to inflammatory states by psychosocial stress is oxidative
38 stress, which appears to precede the inflammatory state (Kalinichenko et al., 2019). For
39 example, some studies reported that basal oxidative alterations could be a predisposing
40 factor to the self-perception of psychosocial stress and major depression (Münzel and
41 Daiber, 2018; Shimanoe et al., 2018). Therefore, oxidative stress and chronic
42 inflammation are two interconnected elements associated with the human psychosocial
43 or behavioral animal stress response.

44 Despite the negative effects caused by an exposure to chronic emotional stress,
45 some individuals have the ability to withstand or quickly recover from difficult
46 conditions. Therefore, although some subjects are resilient, others can present negative
47 manifestations of resilience, such as fear, anxiety, several stress-associated negative
48 emotions, and major depressive disorder (Liu et al., 2016; Cai et al., 2017). Previous
49 studies showed that elevated basal superoxide anion levels triggered by the VV- SOD2

50 genotype of the *manganese-dependent superoxide dismutase* gene (Val16Ala-SOD2,
51 rs4880) single nucleotide polymorphism (SNP) could increase the risk of depression
52 (Gałecki et al., 2010; Pietras et al., 2010; Wigner et al., 2018; Jung et al., 2019) and
53 self-perception of psychosocial stress in elderly subjects (Jung et al., 2019). Moreover,
54 the VV-SOD2 genotype has been consistently associated with an increased level of
55 proinflammatory cytokines (Duarte et al., 2010; Montano et al., 2012; Barbisan et al.,
56 2017). Despite this, contradictory results have been reported on the influence of
57 superoxide anion imbalance on resilience indicators, as these indicators may be
58 influenced by other environmental and genetic factors.

59 Conversely, if the oxidation-inflammation imbalance associated with the
60 superoxide anion was an important element in modulating resilience, it should also
61 affect primitive species. An organism that could provide us with better information
62 about the effect of the superoxide- hydrogen peroxide (S-HP) imbalance would be
63 earthworm, such as *Eisenia fetida*. These animals are regularly exposed to microbes and
64 pollution generated by humans. Studies have revealed that damage of the immune
65 system of earthworms can lead to alterations of morphological and cellular
66 characteristics of worms, activation of signaling pathways, and strongly influence their
67 survival (Ghosh, 2018). Moreover, the earthworm immune system has cellular and
68 humoral elements similar to those found in vertebrate immune responses, including the
69 formation of extracellular traps (ETs) by coelomocytes, which are similar to
70 neutrophils, to combat pathogens and other antigenic molecules (Homa, 2018; Alves et
71 al., 2019).

72 Earthworms also present a well-developed ganglionic central nervous system
73 (CNS) and an immune system (Barna et al., 2001; Csoknya et al., 2012; Ghosh, 2018).
74 Under some acute stress conditions, earthworms exhibit a mitigating behavior (Shi et

75 al., 2017). They can present a pro-social gregarious behavior, especially when exposed
76 to stressful situations, by temporarily curling together to form worm clusters (Zirbes et
77 al., 2012; Wilson et al., 2014; Syed et al., 2017). These responses are strongly affected
78 by water and chemical concentrations that can have some effect on the coelomic fluid,
79 which also has a hydraulic skeleton function (Roeben et al., 2020).

80 Therefore, the present study evaluated the effect of pharmacologically-induced
81 superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance. This effect of S-HP imbalance was
82 initially observed by oxidative stress and immune markers analysis, including the
83 antimicrobial efficiency of earthworms in capture, encapsulate and kill large
84 microorganisms forming brown body structures (Homa, 2018; Alves et al., 2019).
85 Moreover, the effect of S-HP imbalance on behaviors related to the acute stress
86 response of earthworms was also evaluated since these protocols could indicate the
87 differential modulation of resilience patterns by superoxide anions. As the Val16Ala-
88 SOD2 SNP also produces a homozygous genotype (AA) with increased baseline levels
89 of hydrogen peroxide, this imbalance was also pharmacologically produced and its
90 effect on oxidation-inflammation and behavioral markers of the earthworm was
91 investigated.

92 **2. Materials and methods**

93 **2.1. Reagents and equipment**

94 All chemicals, molecular and cell cultures reagents, and other supplies used here
95 were purchased from the following commercial sources: Sigma Aldrich (St. Louis,
96 Missouri, USA), Vitrocell-Embriolife (Campinas, São Paulo, Brazil), Gibco-Life
97 Technologies (Carlsbad, California, USA), Qiagen (Hilden, North Rhine-Westphalia,
98 Germany), Ludwig Biotechnology (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brazil), Invitrogen
99 (Carlsbad, California, USA), Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, USA), and

100 BD Biosciences (San Jose, California, USA). The BV-2 (cell line) mice strain was
101 obtained from the Interlab Cell Line Collection (ICLC, code ICLC ATL03001, Genova,
102 Italy). Spectrophotometric, fluorimetric, flow cytometry, and molecular analyses were
103 performed using the following equipment: SpectraMax i3x Multi-Mode microplate
104 reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), Rotor-Gene Q 5plex HRM
105 System (Qiagen, Hilden, North Rhine-Westphalia, Germany), NanoDrop™ 1000
106 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), Leica
107 DMI 4000B microscope, (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), and
108 FACSCanto Flow Cytometer™ II (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Data
109 acquisition and cell content analysis were performed using Flow Jo vX.0.7 software
110 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

111

112 2.2. General study design

113 The experimental protocols performed here were based on previous *in vitro*
114 studies that evaluated the effect of pharmacological S-HP imbalance on cancer and
115 healthy cells (Berto et al., 2015; Azzolin et al., 2016, Schott et al., 2017; 2018; Jobim et
116 al., 2019).

117 From a pilot experiment testing five concentrations of porphyrin chloride
118 (MnTBAP), a SOD2 agonist that induces an increase in HP levels following S-anion
119 dismutation was chosen for the assays at a concentration of 10 μ M. We did not directly
120 apply a H₂O₂ solution, as H₂O₂ is a highly reactive molecule that causes extensive
121 damage to all cellular compartments. Earthworms exposed to porphyrin were termed
122 “AA-like” in reference to the human AA-genotype found in the Val16Ala-SOD2 SNP,
123 which triggers an increase in basal HP levels (Bresciani et al., 2015). Unlike previous
124 studies, we did not use paraquat to generate the S-imbalance. The exposure of

125 earthworms to paraquat induces a highly aversive behavior, and has remarkable effects
126 on the nervous system, similar to those observed after pesticide exposure. Instead,
127 rotenone was used. Rotenone is a colorless, odorless, crystalline isoflavone used as a
128 broad-spectrum pesticide that occurs naturally in the seeds and stems of several plants,
129 especially in members of the Fabaceae family; the compound interferes directly with the
130 electron transport chain of mitochondria, inhibiting the transfer of electrons in complex
131 I and increasing the S-anion levels. Rotenone is used at different doses in experimental
132 models to induce Parkinson-like (Johnson and Bobrovskaya, 2015) or bipolar disorder
133 conditions (Scola et al., 2014; Viswanath et al., 2015; Machado et al., 2016). A previous
134 study showed relevant neurotoxicity in *Lumbricus terrestris* exposed to rotenone for 24
135 h (Subaraja and Vanisree, 2016). These authors also showed that rotenone
136 bioaccumulates into the body of the worm, causing a degenerative effect on giant fibers
137 affecting neuronal behaviors and locomotion. Therefore, we decided to use a 30 nM
138 rotenone concentration, as used by Machado et al. (2016) in their neuronal cells study.
139 This concentration mimics mitochondrial dysfunction. Moreover, earthworms were
140 exposed to rotenone for 24 h, avoiding neurotoxic effects that could interfere with the
141 behavioral analysis performed here.

142 **2.3. Earthworm rearing conditions and ethical research aspects**

143 Earthworms were commercially obtained and acclimated in the Laboratory of
144 Biogenomics, Federal University of Santa Maria, Brazil, for 7 days at $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ in a
145 Bio-Oxygen Demand (BOD) incubator under a 12/12 h dark/light cycle. Before being
146 used in the experiments, earthworms were reared for 30 days in small plastic boxes
147 (18.5 cm \times 18.5 cm \times 6.5 cm) protected from the light containing sterilized soil and
148 cattle manure (10:1 proportion) at 80% - 85% humidity. The sterilization of the soil
149 used in this treatment was done in an oven at 200°C for 2 h to kill nematodes and other

150 potential worms, parasites, and pathogens. Approximately 500 g of this wet soil was
151 placed in each container.

152 The experiments were conducted using juvenile earthworms selected based on
153 the absence of well-developed clitella (Halwasia et al., 2018), to avoid possible
154 reproduction-related bias. The experiments were performed independently in triplicates.
155 In many countries, such as Brazil, prior approval by the Animal Ethics Committee for
156 studies involving earthworms is not required. However, all experiments conducted were
157 performed in accordance with the ethical principles of animal experimentation that aim
158 to avoid discomfort and unnecessary suffering.

159

160 **2.4. S-HP pharmacological imbalance protocol**

161 Earthworms were exposed directly to porphyrin and rotenone and the contact
162 test was performed as described in the Organisation for Economic Co-operation and
163 Development (OECD) guidelines #207 (1984), with some modifications. Briefly, filter
164 paper was impregnated with 1 mL of porphyrin or rotenone, left in the dark to
165 evaporate, and then dried. To free the gastrointestinal tube of soil and other substances,
166 earthworms were initially transferred to Petri dishes containing 2 mL of *Lumbricus*
167 balanced salt solution (LBSS) (Engelmann et al., 2005). Subsequently, three
168 earthworms were placed in each Petri dish between two filter papers moistened with 1.5
169 mL of LBSS. As exposure to rotenone for longer than 7 days may cause
170 neurodegeneration (Subaraja and Vanisree, 2019), we opted for an exposure period of
171 24 h in most of the protocols, similar to the experiment performed by Subaraja and
172 Vanisree (2016) using *Lumbricus terrestris*. After this period, oxidative, immune
173 function, and behavioral analyses were performed. Acute toxicity (24 h) studies were

174 performed according to OECD guidelines (#207) as adopted by Ahmed et al. (1991) in
175 their *L. terrestris* assessment.

176

177 **2.5. Immune function and oxidative markers assays**

178 Earthworms have a complex and efficient immune system that allows the animal
179 to survive in an environment that is very rich in contaminants and microorganisms.
180 Earthworms present several cellular components, including coelomocytes,
181 chloragocytes, eleocytes, granulocytes, natural killer (NK) cells, and NK-like effectors
182 cells with similar functions as human immune cells (Engelmann et al., 2016). One
183 strategy that the earthworm uses to kill large microorganisms or remove unwanted
184 substances and fragments from the body is encapsulation forming nodules. These
185 nodules are produced by the aggregation of immune cells that initially produce
186 extracellular traps (EETs). EETs are similar to human neutrophils extracellular traps
187 (NETs) composed of extracellular DNA, histone H3, and other proteins (Homa, 2018).
188 When the nodule is 1 – 2 mm-wide, the cells on its edge flatten out, this structure
189 quickly darkens via melanization. At this moment, the nodule detaches from the
190 medium and starts to float, forming the so-called brown bodies. After the formation of
191 brown bodies, they are pushed to the posterior sections of the worm. When there is a
192 considerable accumulation of these structures, the worm performs autotomy to release
193 them. Soon after, the self-cut section is regenerated (Bilej et al., 2010). Here we studied
194 whether the S-HP imbalance could cause changes in the immune response of
195 earthworms related to the formation of brown bodies in the presence of microorganisms.
196 The formation of EETs, nodules, or brown bodies can be observed *ex vivo* using dyes,
197 such as DNA Picogreen, which binds to the DNA molecule and emits fluorescence or
198 Panoptic Kit die (Alves et al., 2019). Briefly, coelomocyte suspensions (100 μ L) were

199 seeded into a 6-well plate (1×10^7 cells/mL) using Dulbecco's Modified Eagle Medium
200 (DMEM) medium supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic
201 and incubated for 2 h at 27°C in an incubator under humid conditions. A volume of 40
202 μ L of inactivated (by hot boiling) yeast (1×10^7 cells/mL) was added to each well for 2
203 h.

204 Further, one 6-well plate was stained using Fast Panoptic kit (FPK) staining with
205 the addition of 100 μ L of the first solution to the cultures for 10 s. The excess solution
206 was gently removed using a Pasteur pipette. The second and third solutions were added
207 in a similar manner. The plates were then washed with Phosphate-buffered saline
208 (PBS), dried, and analyzed using optic microscopy ($\times 100$ and $\times 200$ magnifications).

209 The analysis of some oxidative markers of coelomic fluid was included in this
210 protocol to confirm that rotenone and porphyrin triggered an oxidative imbalance in
211 earthworms. Coelomocyte extrusion was performed as described by Alves et al. (2019),
212 using ether as an irritant substance in a 15 mL tube. The earthworms were removed
213 from the tube; then, 2 mL of LBSS were added to the extruded coelomic fluid, gently
214 shaken, and used for flow cytometric evaluation of the cellular immune pattern. The
215 size and cell granulometry, as described by Engelmann et al. (2016), were used to
216 determine the leucocyte and coelomocyte populations after treatment. The cells were
217 sorted in accordance with their forward scatter/side scatter (FSC/SSC) patterns.

218 Several oxidative markers were quantified and compared among treatments. (1)
219 Reactive oxygen species (ROS) levels were quantified using the dichlorofluorescein
220 diacetate assay (DCFDA) at an excitation and emission wavelengths of 485 and 520
221 nm, respectively, as previously described by Costa et al. (2012). (2) Lipoperoxidation
222 was estimated by the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)
223 measured spectrophotometrically and read at 532 nm (Jentsch et al., 1996). (3) Protein

224 carbonylation levels were quantified spectrophotometrically at 370 nm, following the
225 Levine method (Wehr and Levine, 2013). All variables were corrected for the
226 concentration of protein. (4) The genotoxic effect of rotenone and porphyrin exposure
227 was determined using the alkaline comet assay, as described by Cigerci et al. (2016) and
228 Montagner et al. (2010). In total, 100 cells (50 cells from each of the two replicate
229 slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to the tail
230 length from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). The damage index of cells
231 ranges from 0 (cells with no migration) to 400 (cells with maximal migration). The
232 slides were analyzed under blinded conditions (i.e., researchers were blinded to the
233 treatment administered) by, at least, two different researchers.

234 The effect of the S-HP imbalance on the efficiency of *E. fetida* immune response
235 efficiency was determined using the NET assay, as described by Alves et al. (2019),
236 with some modifications. Briefly, a coelomocyte suspension (100 μ L) obtained after
237 each treatment was kept in two 6-well plates (1×10^7 cells/mL) using DMEM medium
238 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics, and incubated for
239 30 min at 27°C in a humid incubator. Then, 40 μ L of a hot-boiling inactivated yeast
240 suspension (1×10^7 cells/mL) was added to each well for 60 min. Further, the plate was
241 centrifuged at 150 $\times g$ for 2 min and the supernatant was discarded. Coelomocyte
242 monolayers were washed with PBS and dyed using Fast Panoptic Kit (FPK) staining
243 (LaborClin, PR, Brazil), in accordance with the manufacturer's instructions, or DNA
244 Picogreen fluorescent dye (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent Kit, Invitrogen,
245 USA), that has a high affinity to double-stranded (ds) DNA molecules. Images captured
246 using Picogreen® dye fluorescence can be observed in blue (485 – 500 nm) or green
247 (500 – 565 nm), when this dye is bound to dsDNA.

248 The analysis also included an evaluation of the influence of S-HP on the
249 expression of two genes associated with the inflammatory response of earthworms:
250 *Toll-like receptor gene (EaTLR, NCBI: JX898685)* and *antimicrobial peptide (AMP)*
251 *gene (AF060552)*, also known as “*lumbricin 1*” (Cho et al., 1998). Both genes are
252 modulated by the presence of microorganisms and by tissue injury in earthworms (Mo
253 et al., 2012; Škanta et al., 2013). Briefly, earthworms were rinsed with distilled water,
254 dried, and ground with liquid nitrogen. For each replicate, RNA was obtained from, at
255 least, three earthworms. The RNA was extracted using Quick-Zol (TriZol, Ludwig
256 Biotech Co, Alvorada, Brazil), in accordance with the manufacturer’s instructions, and
257 quantified using the NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific,
258 Waltham, MA, EUA). Further, RNA samples were treated with 0.2 µL of Dnase
259 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C for 5 min, to digest any
260 DNA contamination, and at 65°C for 10 min. Gene expression was evaluated using
261 qRT-PCR by using a thermocycler (Axygen® MaxyGene II Thermal Cycler, Corning
262 Life Sciences, Tewksbury, MA, EUA). The reverse transcription phase was performed
263 using the following primers: *EATLR* (forward: 5'-GAGACATCGCTGAAAACATC-3';
264 reverse: 5'-CTGCATCTGAATCTGGAGTC-3') (Škanta et al., 2013) and *AMP*
265 (forward: 5'-CATACTCGGAACGCAAGAACC-3'; reverse: 5'-
266 TTTGATGACCTTCTGCGGTG-3') (Mo et al., 2012). RNA was reverse transcribed to
267 cDNA in the presence of 1 µL of iScript reverse transcriptase and 4 µL of iScript Mix
268 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) using the following reaction steps: 25°C
269 for 5 min; 42°C for 30 min; 85°C for 5 min; and 5°C for 60 min.

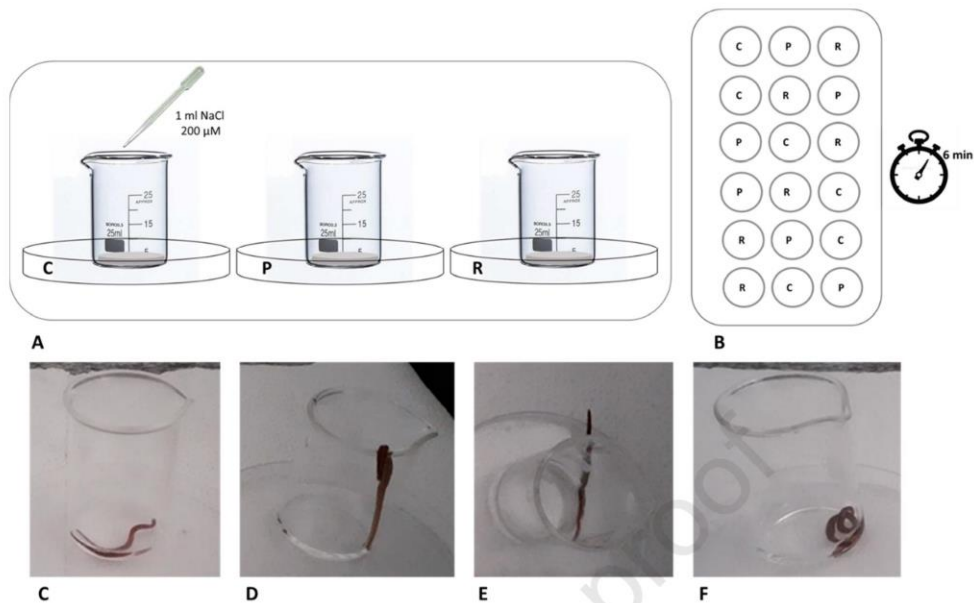
270 PCR analysis was conducted using 1 µL of cDNA and 1× QuantiFast SYBR
271 Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Each reaction was performed in a volume
272 of 20 µL containing 1 µL of cDNA sample (1:20 dilution). The following cycling

273 conditions were used to amplify both genes: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of
274 95°C for 5 s, and 60°C for 30 s, followed by a melting gradient from 50°C to 90°C (1°C
275 increments every 5 s). Reactions were performed in duplicates and *beta-actin* (Y09623)
276 was used as the housekeeping gene (forward: 5'-CGCCTCTTCATCGTCCCTC-3';
277 reverse: 5'-GAACATGGTCGTGCCTCCG-3'). After the reaction, amplification curves,
278 melting curves, and the standard curve slope were checked to ensure that non-specific
279 amplification did not occur. A relative quantification of Ct values was performed as
280 described by Mo et al. (2012).

281 **2.6. Stress behavior assays**

282 Earthworm avoidance behaviors are widely used to evaluate soil ecotoxicity (Shi
283 et al., 2017). From these and other behavioral studies described for this species, two
284 experimental protocols were developed. The first evaluated the extent to which the S-
285 HP imbalance influenced the responsiveness of earthworms to rapid escape stress
286 conditions. The individual rapid escape (IRE) assay was based on the protocol
287 previously described by Halwasia et al. (2018), with some modifications (**Figure 1**).
288 Although earthworms are averse to light, the experiments were conducted in a bright
289 environment. In our protocol, we replaced the test tubes with a dry 25 mL beaker. Three
290 beakers were prepared side by side and placed on the top half of a Petri dish for an easy
291 handling. The beakers were prepared for the earthworms that received rotenone,
292 porphyrin, and control treatments. For each round of the experiment, the cup location
293 was changed to avoid any spatial influence on the obtained results. In total, 10
294 earthworms from each treatment were used in the trial. For each test, the beaker was
295 replaced to remove the influence of mucus secretion, which is used in earthworm
296 communication. A solution of NaCl (200 mM) was placed in each beaker using a
297 Pasteur pipette to ensure that the solution did not touch the vessel walls.

298 The assay procedure is presented in **Figure 1**. Earthworms were first placed in
299 Petri dishes with distilled water for 2 min, as previously described in the reference
300 work. Then, earthworms were transferred to the beaker. Considering that in the study by
301 Halwasia et al. (2018), an average time of 2 min was required for the earthworms to
302 climb the walls of the tube, we estimated a total time for each protocol of a maximum of
303 6 min. This time was considered sufficient for earthworms to exhibit an escape behavior
304 without experiencing adverse effects from the saline environment. All tests were filmed
305 to allow a more careful evaluation of the results. The following parameters were then
306 evaluated. (1) Total time for earthworms to come out of the beaker and migrate to the
307 Petri dish. The total time was calculated by subtracting the final time (TF) from the
308 initial time (TO), determined from the time when the worm was placed inside the
309 container. (2) Sometimes, the earthworms did not fully perform this action. Therefore,
310 the results also considered the following qualitative parameters: (1) completed task
311 (TC); (2) partial completion of the task (PT), when the earthworms no longer had
312 contact with the saline solution but did not fully come out of the beaker; (3) temporary
313 curling that is common in adverse environmental situations (Zirbes et al., 2012). This is
314 a protective behavior, triggered, in particular, in the presence of water stress.



315

316 **Figure 1** – Overview of the rapid escape stress behavior test for the *E. fetida*
 317 earthworms exposed to a saline solution. (A) After the earthworms were collected and
 318 placed in a container with distilled water for 2 min, they were transferred to clean, dry
 319 beakers containing 1 mL of 200 mM NaCl placed inside a Petri dish identified with
 320 each treatment (C = control; R = 30 nM rotenone; P = 10 μM porphyrin). B) The order
 321 of each treatment was changed every round. (C) The earthworm was carefully placed in
 322 the saline solution, ensuring that it did not touch the walls, and the timer was started.
 323 (D, E) The test was considered complete when the earthworm escaped from the beaker
 324 and migrated to the Petri dish that the beaker was placed in. From the pilot tests, it was
 325 observed that a maximum time of 6 min was sufficient for the earthworms to perform
 326 this task. (F) Some earthworms did not exhibit an escape behavior, but instead an
 327 estivation one, in which the earthworm coils together, in small knots, and does not
 328 move, owing to the hydric stress triggered by high salt concentrations. For statistical
 329 purposes, these earthworms were included in the analysis as taking the maximum test
 330 time (6 min). The preferential stress behavior response adopted by control earthworms

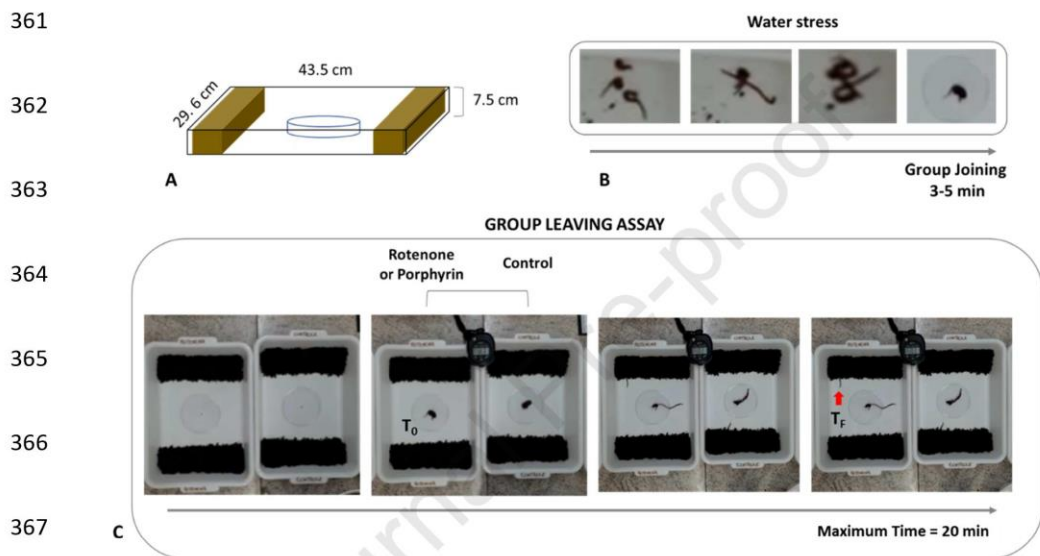
331 was considered to be the most adaptive and most efficient for the survival of this
332 animal.

333

334 The second protocol used as reference was the study by Zirbes et al. (2012),
335 which provided evidence of self-assembled social structures in *E. fetida*, such as cluster
336 formation, based on the evolutionary tendency of individual organisms of some species
337 to aggregate or disaggregate in space, as determined by the environmental conditions. In
338 other words, in dangerous conditions, earthworms tend to exhibit a self-assemblage
339 (joining) behavior; when the conditions become favorable, members of this cluster leave
340 for other places of the substrate (leaving behavior). Therefore, in this assay, we
341 evaluated the ability of earthworms with an induced S-HP imbalance to recognize the
342 existence of a favorable location and to migrate to this location. In the assay,
343 earthworms were first placed in a water container to generate stress and induce a joining
344 behavior. This type of test allowed us to evaluate how much rotenone and porphyrin
345 could influence the survival behavior of earthworms after exposure to a stressful
346 situation. The main phases of the grouping/leaving assay developed here are presented
347 in **Figure 2**.

348 The following parameters were then evaluated: (1) the time taken for worms to
349 ungroup and leave the Petri dish (identified by the time the worm touched the plastic
350 container with its head); (2) the time taken for earthworms to recognize, migrate to, and
351 fully enter the soil substrate; (3) it is important to note that earthworms can also
352 individually form a type of knot to protect against a hostile environment. This is
353 considered an estivation behavior and was previously described by McDaniel et al.
354 (2013) when earthworms were reared in tough conditions. Therefore, it was also
355 observed whether some individuals presented this behavior after the ungrouping. This

356 behavior could indicate that earthworms may have had some difficulty in recognizing
 357 that there could be a safe soil substrate. Other parameters considered in the analysis
 358 were: the side chosen by each worm to migrate to the soil substrate (right or left) and
 359 the occurrence of a dominant behavior, as some individuals showed a faster plate exit
 360 pattern.



371 **Figure 2** – Based on previous studies that described the social behavior (via aggregate
 372 formation) adopted in hazardous situations, this assay was structured to assess how
 373 much time was required for earthworms, subjected to water stress by exposure to a
 374 container with water for 2 min, to present an “aggregation behavior”, and to further
 375 move to a dry inverted Petri dish to disaggregate from the group (leaving behavior), and
 376 to identify and migrate to a protective substrate (moist and nutritious soil). Through this

377 test, the efficiency of the self-preservation behavior of each worm in the group was
378 evaluated. (A) The test was performed in a rectangular container with soil at both ends
379 and an inverted Petri dish in the center. For each replicate, new containers were used to
380 prevent the mucus produced by the worm aggregation from influencing the behavioral
381 pattern of the other aggregates tested here. Pre-clitellate earthworms (~ 30 days) were
382 used in all experiments.

383 (B) Representative photos showing the formation of earthworm aggregates, when
384 placed inside a container with water. Usually, these aggregates form within 2 min of
385 exposure, if the earthworms are placed next to each other. (C) Representative photos of
386 the sequence of behaviors observed in the assay. Two time points were measured: the
387 first was an evaluation of when the leaving group behavior ended, when the worm
388 touched its head to the floor of the container and did not return to the central place
389 where the group was placed with the aid of a brush; the second time point evaluated the
390 time of exploration, identification, and complete migration into the soil (protective
391 substrate) by the earthworm. From the pilot tests, it was estimated that most earthworms
392 completed the task within 20 min, and this was considered the maximum test time.
393 Earthworms that did not enter the soil within this period were considered to have failed
394 the self-preservation and survival behavior test. As the time taken to migrate to the soil
395 increased, the survival behavior was deemed less efficient.

396

397 2.7. Statistics

398 Comparisons among treatments were performed using GraphPad Prism software
399 (version 8.02, 2019). Data were compared among treatments using analysis of variance,
400 followed by Tukey's *post-hoc* test or by Kruskal-Wallis non-parametric analysis of
401 variance, followed by Wilcoxon-Mann-Whitney *post hoc* test. The data in graphics were

402 presented as the mean plus the 95% confidence interval (95% CI), which were the most
403 representative statistical parameters for the comparison of treatments. Categorical
404 variables were compared using the Chi-square or Fisher's Exact test and presented as
405 relative frequency (%). The area of brown bodies (BB; in μm) was compared using the
406 Digimizer image analysis software package (version 5.4.1, MedCalc Software,
407 Belgium), which allowed manual measurements, as well as automatic object detection,
408 for the measurement of object characteristics. All tests with a $p \leq 0.05$ were considered
409 statistically significant.

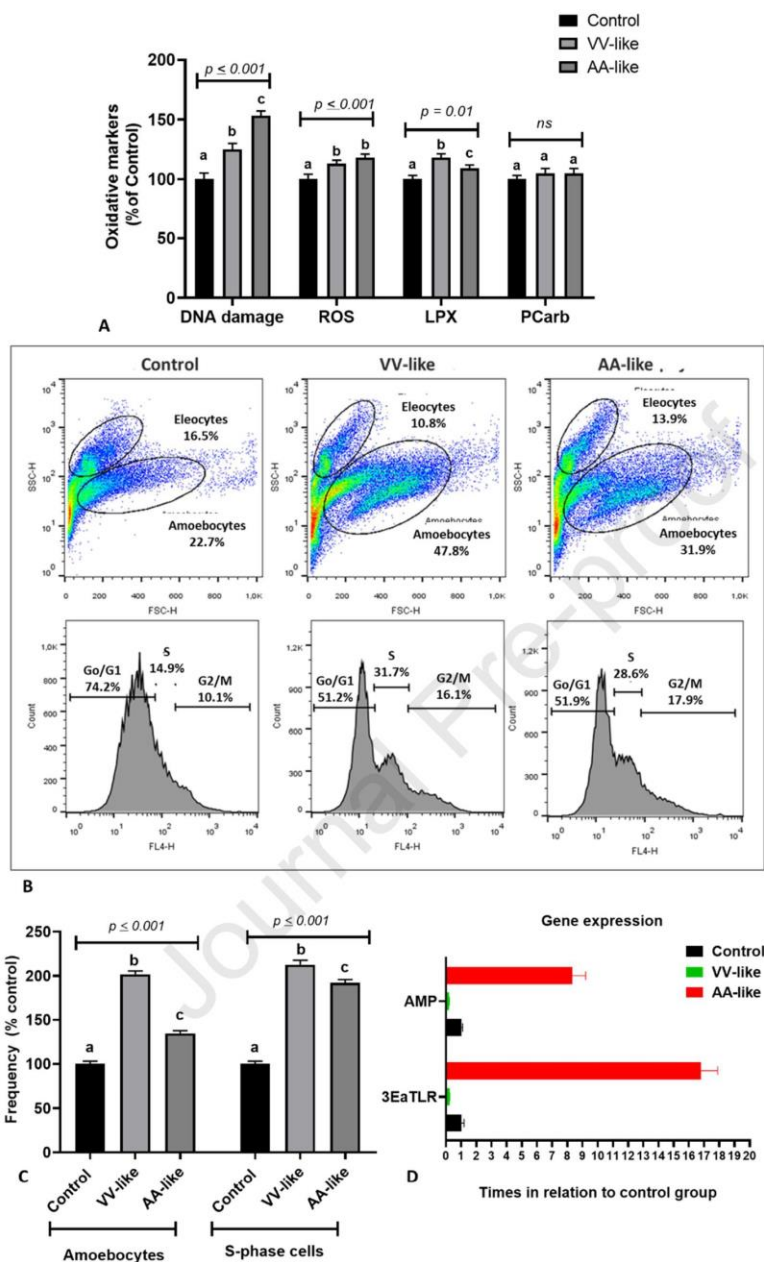
410 3. Results

411 For the initial evaluation of the action of rotenone and porphyrin on earthworms,
412 oxidative markers were compared among treatments (Fig 3A). Therefore, in this assay,
413 we evaluated the ability of earthworms with an induced S-HP imbalance to recognize
414 the existence of a favorable location and to migrate to this location. In the assay,
415 earthworms were first placed in a container of water to generate stress and induce a
416 joining behavior. Elevated lipoperoxidation (LPX) levels were found in VV-like
417 earthworms, compared with the control group. AA-like earthworms also showed higher
418 LPX levels compared with untreated earthworms. Conversely, Protein carbonylation-
419 PCarb levels were similar among groups. As these results confirmed that rotenone and
420 porphyrin triggered an S-HP imbalance, immune and stress behavior assays were
421 performed and compared between treatments.

422 Flow cytometry analysis of immune cell patterns showed a significant increase
423 in amoebocyte frequency compared to leucocytes, in both VV- and AA-like earthworms
424 ($p < 0.001$). However, this effect was more pronounced in VV-like than in AA-like
425 earthworms (Fig. 3B, C). Cell cycle analysis also showed an increase in the frequency
426 of S-phase cells, indicating that rotenone and porphyrin induced inflammatory cell

427 proliferation, compared with untreated earthworms (Fig. 3B). Despite an increased
428 proportion of amoebocytes, there were differences in gene expression between VV- and
429 AA-like earthworms (Fig. 3D). Whereas AA-like treatment induced an overexpression
430 of the *EaTLR* and *AMP* immune genes, VV-like treatment downregulated both genes
431 compared with the control.

Journal Pre-proof



432

433 **Figure 3** – Superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance affects the oxidative
 434 markers and immune system of *E. fetida*. Earthworms were treated for 24 h with 30 nM
 435 rotenone to induce the VV-like phenotype; and for 24 h with 10 μ M porphyrin to induce
 436 the AA-like phenotype, as a model of the reference basal S-HP imbalance associated

437 with the human Val16Ala-SOD2 polymorphism. (A) DNA damage was determined
438 using the comet assay; ROS = reactive oxygen species; LPX = lipoperoxidation; Pcarb
439 = protein carbonylation. (B) representative flow cytometry results showing immune
440 coelomocyte populations (leucocytes and amoebocytes) and coelomocyte cell cycle
441 phases of earthworms exposed to an S-HP imbalance. (C) Comparison between
442 frequency (% of control) of amoebocytes and S-phase cells from treatments using data
443 from flow cytometry analysis was performed using chi-square statistical test. Different
444 letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$); (D) Comparison between gene
445 expression determined using qPCR and normalized to the expression of β -actin, a
446 housekeeping gene. Controls were used as a reference to calculate the relative mRNA
447 expression of *EaTLR* and *AMP*, which are immune-related genes, in VV-like and AA-
448 like earthworms. The control value was set to 1. Compared with the control group,
449 values lower than 1 indicated a downregulation of gene expression and values higher
450 than 1.5 indicated an upregulation of gene expression.

451 The effect of S-HP imbalance on immune function was evaluated by the ability
452 of coelomocytes to produce brown bodies (BB) when exposed to dead yeast cells. Two
453 analyses were performed: the first compared the area (μm) of mature brown bodies
454 produced after exposure to yeast for 2 h, and the second compared the frequency of
455 mature and immature brown bodies (in formation) after exposure to dead yeast for 2 h.

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

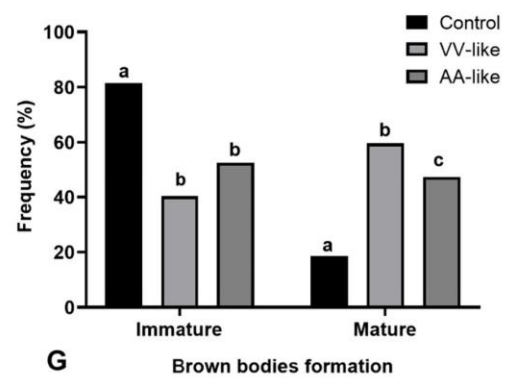
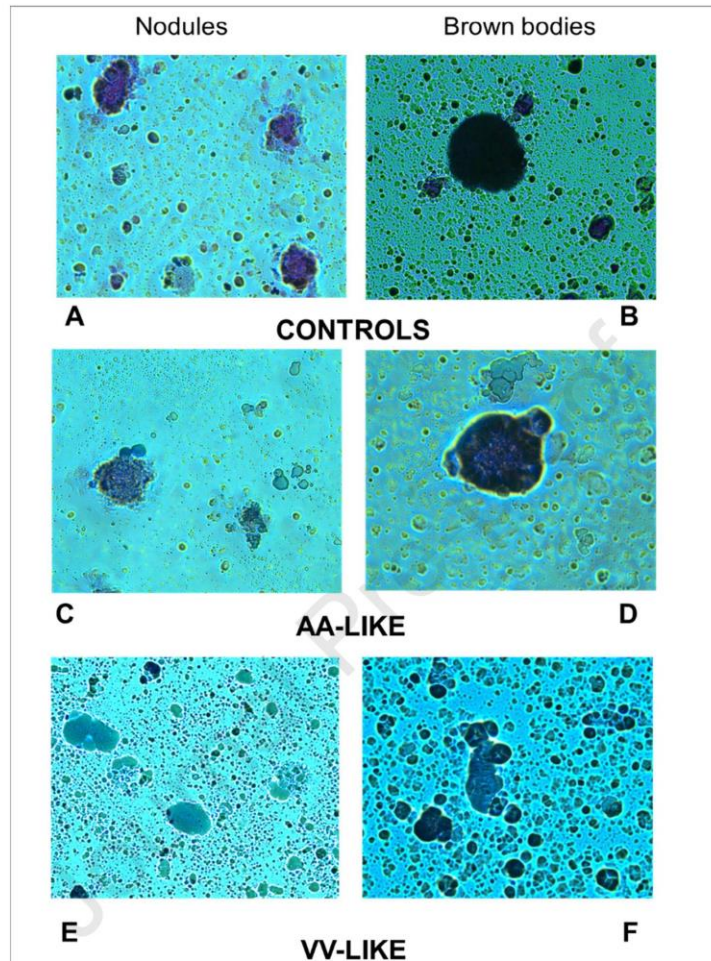
477

478

479

480

481



482 **Figure 4** – Effects of superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance on the
483 antimicrobial encapsulation process of *E. fetida* earthworm. Animals were treated for 24
484 h with 30 nM rotenone to induce the VV-like phenotype; and for 24 h with 10 μ M
485 porphyrin to induce the AA-like phenotype to model the reference basal S-HP
486 imbalance associated with the human Val16Ala-SOD2 polymorphism. When extruded
487 coelomocytes are exposed to dead yeast, an encapsulation process is triggered, that
488 involves the aggregation of amoebocytes and other immune cells, which produce ETs
489 (extracellular DNA-traps) that capture and engulf yeast cells and form a large
490 multicellular structure. As this complex is formed, it is darkened due to melanin
491 production and the edges flatten out to release a spherical structure known as a “brown
492 body.” The larger the structure, the greater the ability to seize and destroy
493 microorganisms. Therefore, the efficiency of earthworm immune activity can be
494 assessed by the frequency and size of brown bodies formed over a given time. In the
495 assay, the frequency of immature nodules (in formation) and mature brown bodies was
496 analyzed after exposure to dead yeast for 2 h. A, B = representative immature and
497 mature brown bodies of controls; C, D = representative immature nodules and mature
498 brown body of AA-like earthworms; E, F = representative immature nodules and mature
499 brown body of VV-like earthworms; (G) Frequency of immature nodules and mature
500 brown bodies was compared among treatments using Chi-square statistical test.
501 Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

502

503 Representative microphotographs of immature and mature brown bodies from
504 different treatments are shown in Figure 4A–D. The mean control area was 170.32 μ m
505 (95% CI = 106.67 – 450.37 μ m). AA-like earthworms presented brown bodies with
506 larger areas than the control group (median = 221.75 μ m, 95% CI = 221.75 – 413.61

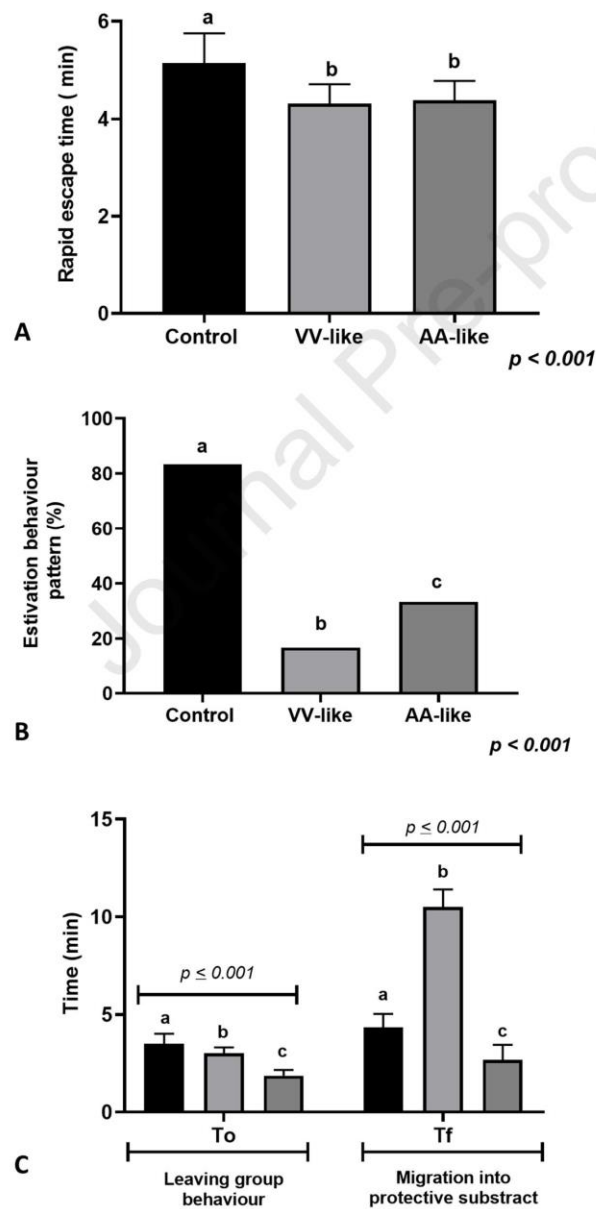
507 μm). Conversely, VV-like treatment induced the formation of smaller brown bodies
508 than those observed in the control group (median = 51.71 μM , 95% CI = 62.69 – 136.47
509 μm) ($p \leq 0.001$). Although the area of brown bodies was lower in VV-like earthworms,
510 there was a higher proportion of these encapsulated mature structures than in control or
511 AA-like earthworms (Fig. 4G). Microscopic analysis indicated that the formation of
512 melanized brown bodies was faster in VV-like earthworms, which decreased the size of
513 these brown bodies. ET areas were also smaller in VV-like earthworms than in control
514 and AA-like earthworms.

515 The effect of S-HP imbalance on the influence on earthworm response in the
516 two-stress behavior assays. In the 6-min rapid escape analysis, AA-like earthworms
517 required a longer time (median = 4.31 min, 95% CI = 0.25 – 4.93 min) than VV-like
518 earthworms (median = 3.48 min, 95% CI = 0.51 – 4.41 min) ($p \leq 0.001$); both were
519 faster than control earthworms (median time = 5.01 min, 95% CI = 0.41 – 6.00 min)
520 (Figure 5A).

521 The main reason the controls did not exhibit a rapid escape behavior from the
522 saline solution was that most animals adopted a protective pattern, forming small knots
523 and body folds (estivation behavior) when exposed to hydric stress (very dry or very
524 wet environments). However, in VV-like earthworms, this behavior was very infrequent
525 (Figure 5B).

526 In the second test, an aggregation behavior was induced in earthworms by
527 exposure to a wet environment. Further, animals were transferred to another local
528 substrate (smooth and dry glass) with the option to identify and migrate to two places
529 containing moist and nutritive soil substrate. The time for the earthworms to
530 disaggregate and leave the group and the time it took them to fully identify and migrate
531 into the soil were then compared among treatments (Figure 5C). In this assay, AA-like

532 earthworms showed a faster group disaggregation and escape to the substrate (median =
 533 2.66 min, 95% CI = 1.77 – 4.07 min) than the control earthworms (mean = 4.33 min,
 534 95% CI = 3.79 – 5.93). However, VV-like earthworms often left the Petri dish quickly,
 535 but spent more time exploring the rectangular container until they could identify the
 536 protective substrate and fully enter it (median = 10.51 min, 95% CI = 3.98 – 12.89 min).



537

538 **Figure 5** – The effects of superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance on two
539 behavior survival tests involving hydric stress in *E. fetida*. Earthworms were treated for
540 24 h with 30 nM rotenone to induce a VV-like phenotype, and for 24 h with 10 μ M
541 porphyrin to induce an AA-like phenotype to model the reference basal S-HP imbalance
542 associated with the human Val16Ala-SOD2 polymorphism. To mitigate environmental
543 variation, the tests were always performed concomitantly with the control and treated
544 earthworms and were filmed and analyzed later. Each replicate was performed using
545 three earthworms. (A) The rapid escape test measured the time taken for an earthworm
546 to leave a highly aversive saline solution (NaCl, 200 mM). (B) Frequency of estivation,
547 a survival behavior induced when earthworms are stressed by unfavorable hydric
548 conditions (dry or wet environment) observed in the rapid escape test. (C) Data from a
549 second stress responsiveness test that evaluated the time taken to leave a previously
550 formed social aggregation cluster, and the time taken for these earthworms to identify
551 and migrate to the protective substrate (moist and nutritive soil). Statistical comparison
552 of time taken for both tests was performed using one-way analysis of variance, followed
553 by Tukey's *post-hoc* test. Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

554

555 **4. Discussion**

556 Based on previous investigations that suggested the influence of the S-HP
557 genetic imbalance on inflammation and indicators of human resilience, the present study
558 sought to assess whether a pharmacologically induced S-HP imbalance could produce
559 similar results in *E. fetida* earthworms. The results supported the idea that high levels of
560 superoxide anion could negatively affect the inflammatory and behavioral resilience of
561 earthworms.

562 Therefore, understanding that both the inflammatory and stress responses are
563 evolutionarily adaptive characteristics in animals, we hypothesized that the S-HP
564 imbalance could also modulate these physiological responses in more primitive animals,
565 such as earthworms, that have a ganglionic central nervous system. Therefore, we
566 established an *in vivo* S-HP pharmacological imbalance model by treating earthworms
567 with rotenone, which generates a VV-like phenotype, and porphyrin, which generates an
568 AA-like phenotype.

569 It is also important to consider the reasons for choosing earthworms as an
570 experimental model. Studies have been regularly performed on the immune system
571 using invertebrates as experimental models, including the nematode *Caenorhabditis*
572 *elegans* and the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Ermolaeva and Schumacher, 2014;
573 Buchon et al., 2014). However, in these two models, access to immune cells is much
574 more difficult, whereas in earthworms, access can be easily obtained through exposure
575 to a toxic agent that causes coelomic liquid extrusion and the release of free-floating
576 coelomocytes (Engelmann et al., 2005). Furthermore, earthworms have been used in
577 standardized aversive behavior tests in ecotoxicity studies and also in the technical
578 identification of pollutant-contaminated soils (Shi et al., 2017).

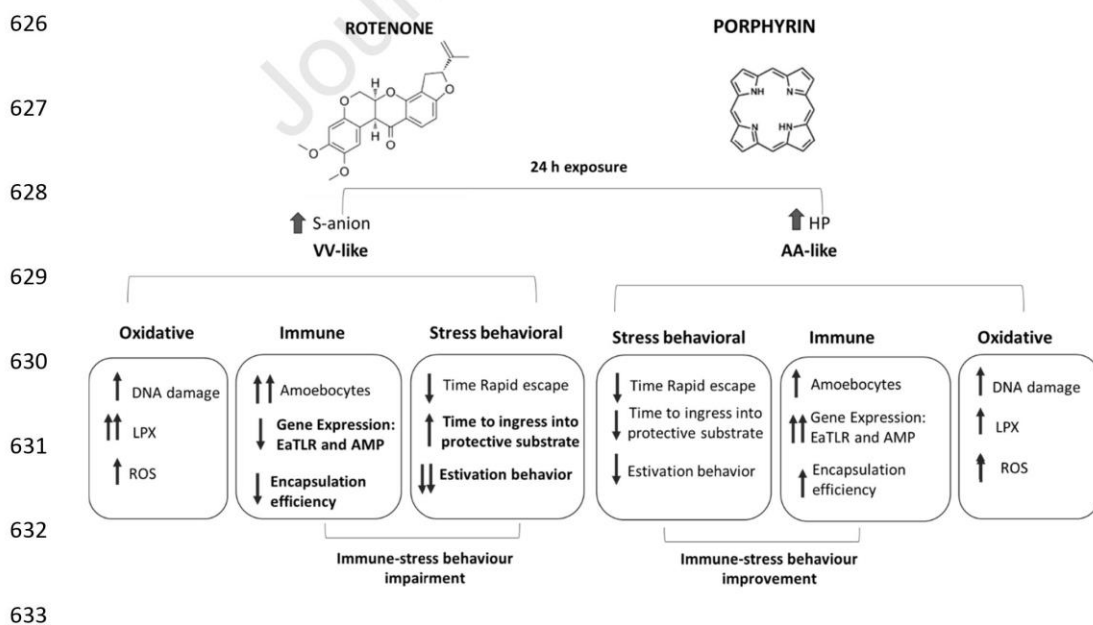
579 The data obtained here showed that both oxidative imbalance phenotypes
580 showed different properties compared to the controls: (1) elevation of some ROS levels
581 (mainly DNA damage and LPX), as previously observed in homozygous genotypes of
582 the Val16Ala-SOD2 SNP (Bresciani et al., 2013; 2015; Barbisan et al., 2017); (2)
583 alteration in the coelomocyte populations and immune gene expression modulation; (3)
584 differential modulation of the efficiency of the antimicrobial response; (4) alterations in
585 the behavioral response of earthworms exposed to two stressful situations related to
586 survival.

587 Given the abundance of experimental data, a general scheme was organized to
588 facilitate the discussion comparing the imbalanced S-HP phenotypes, and is presented
589 in **Figure 6**. First, we discussed the effects of rotenone and porphyrin induction on the
590 immune system. It is known that the inflammatory response is triggered to inactivate or
591 destroy invading organisms, remove irritants, and generate the correct conditions for
592 tissue repair. ROS has a profound influence on the modulation of inflammatory
593 reactions, mainly S-anion and HP molecules. Immune cells generate and release large
594 amounts of S-anion produced by respiratory bursts as a strategy to kill pathogens. With
595 nitric oxide, S-anion plays a key role in the regulation of all immune response steps via
596 multiple mechanisms (Guzik et al., 2003; Thomas, 2017). As S-anion has a relatively
597 short half-life, it is readily degraded to HP, which can pass freely through cell
598 membranes (Thomas, 2017). Therefore, S-anion and HP are signaling molecules for the
599 activation of macrophage cells. These molecules also are involved in neutrophil activity.
600 When these immune cells are activated by microbial exposure, increased production of
601 S-anion levels occurs, mainly via NADPH oxidase (NOX2) action. In turn, S-anion is a
602 precursor of other ROS, especially HP, which help neutrophils engulf bacteria and other
603 microorganisms (Nauseef and Borregaard, 2014; Winterbourn et al., 2016).

604 Since S-anion is continuously produced in mitochondria and is strictly
605 controlled by the action of SOD2 enzyme, increased basal levels of this molecule could
606 induce oxidative and proinflammatory states, as reported (Montano et al., 2012;
607 Bresciani et al., 2015). For example, patients with hypercholesterolemia that were
608 carriers of the VV genotype presented greater resistance to the reduction of the levels of
609 oxidative, inflammatory, and lipid markers, compared with A-allele carriers, following
610 treatment with rosuvastatin (Duarte et al., 2016). Barbisan et al. (2017) confirmed that
611 the S-HP imbalance induced by the Val16Ala-SOD2 SNP could alter the *in vitro*

612 immune response of cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Although
 613 AA-cells produced an acute and higher inflammatory response via increased
 614 proinflammatory cytokines levels, VV-cells tended to present a chronic
 615 proinflammatory state corresponding to longer-term maintenance and elevated levels of
 616 proinflammatory cytokines, such as interleukin 1-beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) and
 617 Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α).

618 Here, the S-HP imbalance altered the coelomocytes populations compared with
 619 the control. In both cases, elevated proportions of amoebocytes were observed, and this
 620 effect was greater in VV- than in AA-like earthworms. It is known that invertebrate
 621 immune cells, especially amoebocytes, exert diverse immunological functions,
 622 including phagocytosis, cytotoxicity, and encapsulation (Valembois et al., 1992;
 623 Cossarizza et al., 1996; Engelmann et al., 2005; 2016). Therefore, it appears that the S-
 624 HP imbalance, especially when S-anion levels were elevated, may have induced a sterile
 625 proinflammatory state.



634 **Figure 6** – Schematic of the main results obtained from the analysis of the effect of
635 superoxide-hydrogen peroxide (S-HP) imbalance on the modulation of oxidative,
636 immune, and behavioral stress markers in *E. fetida*. Earthworms were treated for 24 h
637 with 30 nM rotenone to induce the VV-like phenotype, and for 24 h with 10 μ M
638 porphyrin to induce the AA-like phenotype to model the basal S-HP imbalance
639 associated with the human Val16Ala-SOD2 polymorphism. The up arrows indicate a
640 significant increase in the values of each variable compared with the control group, and
641 the down arrows indicate the opposite. Two arrows indicate significantly higher values
642 than one arrow. ROS = reactive oxygen species; LPX = lipoperoxidation. Overall, the
643 data suggested that the high S-anion levels found in VV-like earthworms caused some
644 impairment of immune function and stress responsiveness compared with controls.
645 Conversely, the high HP-anion levels found in AA-like earthworms appeared to
646 improve immune function and trigger a better or equal stress responsiveness compared
647 with the controls. As the S-HP imbalance triggered an increase in the levels of oxidative
648 markers, the results suggested that S and HP act as signaling molecules, triggering
649 different effects in earthworms.

650 However, it appears that this increase in amoebocyte frequency did not imply a
651 similar immune modulation between VV- and AA-like earthworms. This statement is
652 based on the analysis of the modulation of *EaTLR* and *AMP lumbricin 1* gene
653 expression. Microorganism recognition is a key element of innate immune response,
654 which is mediated by pattern recognition receptors, including TLRs, found in vertebrate
655 and invertebrate species (Satake and Sekiguchi, 2012). However, the upregulation of
656 inflammatory processes may become uncontrolled, culminating in cellular injury and
657 tissue destruction, as associated with several human chronic non-transmissible diseases
658 (Vidya et al., 2018). Therefore, TLR gene expression must be strictly regulated to

659 maintain immune system efficiency. *EaTLR* gene was previously cloned by Škanta et
660 al. (2013) in *E. andrei*, a very closely related species to *E. fetida*, and is constitutively
661 expressed in several cells and tissues, and overexpressed when this animal is exposed to
662 antigens. Moreover, authors found a high similarity of *EaTLR* with polychaete annelids,
663 mollusks, and echinoderms. Further, some slight modifications in the qRT-PCR
664 protocol allowed the expression analysis of this gene in S-HP-imbalanced *E. fetida*
665 earthworms. This analysis revealed it was an antagonist, as the *TLR* gene was
666 downregulated in VV-like earthworms and overexpressed in AA-like earthworms.

667 Similar results were obtained when a second gene related to worm immune
668 response was analyzed. The *AMP* gene, also named the host-defense peptide, is able to
669 activate and recruit macrophages and mast cells, helping to sterilize systemic circulation
670 and local injury sites (Otvos, 2016). In VV-like earthworms, *AMP (lumbricin 1)* gene
671 was downregulated compared with the controls but overexpressed in AA-like
672 earthworms. The antagonistic action of high levels of S-anion and HP could partly
673 explain the differences in the antimicrobial response efficiency observed between VV-
674 and AA-like earthworms. It is also important to highlight that other types of pollutants
675 appear to affect the regulation of this gene. For example, a study performed by Mo et al.
676 (2012) showed that cadmium-exposed *E. fetida* presented a downregulation of *AMP*
677 gene, when earthworms were exposed to high doses of this chemical.

678 The earthworm immune system can eliminate invading microorganisms through
679 several pathways, including excretion by nephridia cells or phagocytosis by
680 amoebocytes, which are then further expelled through dorsal pores. These pores have
681 muscular sphincters that control the exchange of material between the outer and inner
682 environments. However, another important immune strategy to eliminate agglutinated
683 bacteria, gregarines, nematodes, and other large-sized material is the process of

684 encapsulation. In this process, similar to phagocytosis, some coelomocytes recognize
685 and surround foreign body material, including agglutinated bacteria, gregarines, and
686 nematodes (Valembois et al., 1992). ETs are also produced with DNA and proteins
687 during encapsulation (Homa et al., 2016; Homa, 2018; Alves et al., 2019). Immune cells
688 and foreign material begin to condense, become spherical, and are darkened by the
689 action of melanin. When the capsule is approximately 1–2 mm in diameter, its external
690 cells become flattened and lose their adhesiveness, forming a structure termed a “brown
691 body”. These structures remain in the supernatant coelomic fluid and begin to
692 concentrate in the posterior region of the earthworm body, and are eliminated via
693 autotomy (Bilej et al., 2010).

694 Although the encapsulation process does not occur in vertebrates, the formation
695 of ETs observed in earthworms is similar to that produced by human neutrophils, when
696 exposed to microorganisms (Homa et al., 2016; Homa, 2018). Here, AA-like
697 earthworms, when exposed to dead yeast, formed large brown bodies more quickly than
698 the controls. These results suggested that elevation in HP levels could improve
699 microorganism capture, similar to that described by Alves et al. (2019) when
700 earthworms were treated with different beverages rich in methylxanthines and
701 catechins. These results again showed similarity to AA-PBMCs (peripheral blood
702 mononuclear cell), which had a stronger inflammatory response after exposure to
703 phytohemagglutinin, a natural antigen (Barbisan et al., 2017). Although HP is a ROS,
704 consistent evidence has suggested its signaling role in the regulation of various cell
705 routes, including the ability of HP to deactivate bacteria and induce stronger immune
706 responses (Fan et al., 2019).

707 Conversely, VV-like earthworms increased the number of brown bodies, but the
708 size of these structures was very small compared with the structures found in controls

709 and AA-like earthworms. We also did not identify extensive NETs formation by
710 coelomocytes in VV-like earthworms. These results suggested that the elevation of S-
711 anion levels could impair the DNA-NETs formation and induce an early melanization of
712 these immune structures, decreasing the antimicrobial efficiency of encapsulation.
713 However, unfortunately, it was not possible to investigate the role of S-HP imbalance
714 on other immune response pathways.

715 Although S-HP imbalance has been previously linked to changes in immune
716 function, in our study, the main focus was to evaluate if it could directly affect the
717 behavioral response of earthworms to stressful situations. Stress behavior was also
718 altered in earthworms subjected to an S-HP imbalance in both situations tested here.

719 In the first assay, isolated earthworms were placed in a beaker containing a 200
720 mM NaCl solution. This saline solution is an extremely adverse environment, which can
721 induce earthworm dehydration, triggering a rapid escape behavior (Halwasia et al.,
722 2018). When this behavioral test was described, earthworms were placed in a narrow
723 clean dry test tube, they climbed in approximately 5 min. This behavior was also found
724 in our pilot tests. However, to concurrently perform the task with earthworms from the
725 three treatments (control, VV-like, and AA-like) (video available in the supplementary
726 material), we opted to replace the test tube with a beaker having a wider opening,
727 containing the same volume (1 mL) of saline solution. In this setup, most of the control
728 earthworms did not climb the glass walls, but instead adopted a body-folding behavior.
729 Conversely, most VV-like and AA-like earthworms climbed the walls and left the
730 beaker.

731 To investigate this unexpected pattern of behavior in the control earthworms, we
732 reviewed the literature for studies describing this type of stress behavior. Such behavior
733 has been previously named by some authors as an “estivation behavior” related to

734 drought stress. In this situation, earthworms can adopt a coiled position, forming small
735 sealed estivation chambers to reduce water loss. This sealed chamber is coated on the
736 inside with their mucus. To achieve this, they initial twist their bodies up into small
737 knots to reduce the surface area exposure, identified as an estivation pattern. When the
738 environmental conditions are improved, earthworms emerge from the chamber
739 (McDaniel et al., 2013). It is interesting to note that some controls also presented this
740 pattern, indicating that not only the dry environment can trigger this behavior, but also
741 completely humid environments (in this case, when the earthworms were placed in a
742 container with water). Therefore, it is possible that this response is triggered by “water
743 stress or hydric stress” (when the environment is extremely dry or wet). For this reason,
744 we adopted this term to indicate the behavioral tests that were conducted here.

745 Therefore, from the results obtained in the first assay, two conclusions are can
746 apparently be made. The first is that the salinity of a liquid appears to mimic dry
747 environments and trigger estivation, which is an earthworm survival behavior. The
748 second is that the S-HP imbalance appeared to directly affect the sensitivity to salinity
749 conditions and to inhibit the formation of the estivation pattern, especially in VV-like
750 earthworms. In other words, it appears that increased levels of S-anion decreased the
751 earthworm survival behavior generally adopted by controls.

752 The second test was based on the assumption that, in nature, the formation of
753 more or less stable groups of individuals in diverse species, including invertebrates,
754 occurs. Zirbes et al. (2012) described that *E. fetida* exhibits self-assembled social
755 structures involving the formation of temporary clusters. Generally, these aggregates are
756 formed in dangerous situations and increase the survival of the participating individuals.
757 Therefore, based on the results described by Zirbes et al. (2012), we organized an assay
758 in which earthworms were quickly induced to aggregate by placing them in an

759 environment with water. Then, they were placed in a dry and smooth environment,
760 which is aversive to the animal. Nearby, two places containing moist soil and nutrients
761 were offered, to which the earthworms could migrate. This assay assumed that social
762 aggregation was a temporary state in which earthworms come together to protect
763 themselves from a hostile environment and that a rapid decision to leave the group and
764 move towards a protective environment would be an important survival behavior.

765 Again, results suggested that VV-like earthworms had an altered survival
766 behavior. First, they showed a faster leaving behavior than controls, suggesting an
767 impulsive behavior. However, they spent a lot of time exploring the environment before
768 recognizing, choosing, and migrating into the earth, which represented a protective
769 environment. AA-like earthworms displayed a faster leaving and ingress behavior into
770 the protective soil than control earthworms. Thus, it appears that the decision-making
771 and identification of the protective site was more efficient and focused in AA-like,
772 rather than in VV-like earthworms, which showed an impulsive and dispersed pattern.

773 This result may be surprising, given the concept that primitive animals tend to
774 have only stereotyped responses. However, there are many studies, notably a report by
775 Nakashima et al. (2018), showing that earthworms can make individualized decisions,
776 suggesting that these animals could be used as an experimental model to study the
777 evolution of personality. Here, it appears that these decisions could be partially affected
778 by the basal oxidative state of earthworms.

779 Moreover, it is important to note that much of the variability in time
780 measurements of this second protocol was related to the behavior of earthworms that
781 did not leave together from the adverse to the protective site. Indeed, it appeared that in
782 each cluster of earthworms, there were individuals with a dominant exploratory
783 behavior. That is, some earthworms left the group faster than the others. This behavior

784 is in agreement with other studies suggesting the existence of a hierarchical primitive
785 social behavior in earthworms (Zirbes et al., 2012; Wilson et al., 2014; Syed et al.,
786 2017), but it appeared unaffected by the S-HP imbalance.

787 Finally, it is important to comment that as both treatments (rotenone and
788 porphyrin) increased the levels of oxidative markers, but changed the immune gene
789 expression in an antagonistic way, the differential pattern of oxidative stress may not be
790 responsible for the inflammatory stress alterations reported here. Conversely, the data
791 suggest that S-anion and HP levels may act as different signaling molecules in these
792 physiological (immune and behavior) responses.

793

794 **5. Conclusions**

795 The results described here support studies suggesting that the S-HP oxidative
796 imbalance differentially modulates the immune system and influences stress
797 responsiveness. Although this suggestion is speculative in light of the data presented
798 here, future studies could confirm or disprove its validity and allow the use of this
799 information to develop strategies to mitigate the detrimental effects of altered S-anion
800 levels on depressive disorders associated with a low resilience.

801

802

803 **6. Conflict of interest**

804 The authors declare no conflicts of interest.

805 **7. Acknowledgments**

806 We thank the support of grants and fellowships from: Coordenação de
807 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de
808 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processes numbers: 302661/2016-6;

809 400816/2016), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS,
810 processes numbers: 04/2018; 05/2019).

811

812 **8. References**

813 Alves, A.O., Weis, G.C.C., Unfer, T.C., Assmann, C.E., Barbisan, F., Azzolin, V.F.,
814 Chitolina, B., Duarte, T., Ribeiro-Filho, E.E., Duarte, M.M.M.F., Boligon, A., Vélez-
815 Martin, E., Palma, T.V., de Andrade, C.M., da Cruz, I.B.M., 2019. Caffeinated
816 beverages contribute to a more efficient inflammatory response: Evidence from human
817 and earthworm immune cells. *Food Chem. Toxicol.* 134, 1108–1109.

818 Assmann, C.E., Cadoná, F.C., Bonadiman, B.D.S.R., Dornelles, E.B., Trevisan, G.,
819 Cruz, I.B.M.D., 2018. Tea tree oil presents *in vitro* antitumor activity on breast cancer
820 cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells.
821 *Biomed. Pharmacother.* 103, 1253–1261.

822 Azzolin, V.F., Cadoná, F.C., Machado, A.K., Berto, M.D., Barbisan, F., Dornelles, E.B.,
823 Glanzner, W.G., Gonçalves, P.B., Bica, C.G., da Cruz, I.B., 2016. Superoxide-hydrogen
824 peroxide imbalance interferes with colorectal cancer cells viability, proliferation and
825 oxaliplatin response. *Toxicol. In Vitro.* 32, 8–15.

826 Barbisan, F., Azzolin, V.F., Ribeiro, E.E., Duarte, M.M.M.F., da Cruz, I.B.M., 2017.
827 The *in vitro* influence of a genetic superoxide-hydrogen peroxide imbalance on
828 immunosenescence. *Rejuvenation Res.* 20, 334–345.

829 Barna, J., Csoknya, M., Lázár, Z., Barthó, L., Hámori, J., Elekes, K., 2001. Distribution
830 and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of
831 the earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). *J. Neurocytol.* 30, 313–325.

- 832 Berto, M.D., Bica, C.G., de Sá, G.P., Barbisan, F., Azzolin, V.F., Rogalski, F., Duarte,
833 M.M., da Cruz, I.B., 2015. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide
834 imbalance on prostate cancer: an integrative *in vivo* and *in vitro* analysis. *Med. Oncol.*
835 32(11), 251.
- 836 Bilej, M., Procházková, P., Silerová, M., Josková, R., 2010. Earthworm immunity. *Adv.*
837 *Exp. Med. Biol.* 708, 66–79.
- 838 Bresciani, G., Cruz, I.B., de Paz, J.A., Cuevas, M.J., González-Gallego, J., 2013. The
839 MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with
840 environmental factors. *Free Radic. Res.* 47, 781–792.
- 841 Bresciani, G., da Cruz, I.B., González-Gallego, J., 2015. Manganese superoxide
842 dismutase and oxidative stress modulation. *Adv. Clin. Chem.* 68, 87–130.
- 843 Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S., 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster* -
844 from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat. Rev. Immunol.* 14,
845 796–810.
- 846 Cai, W.P., Pan, Y., Zhang, S.M., Wei, C., Dong, W., Deng, G.H., 2017. Relationship
847 between cognitive emotion regulation, social support, resilience and acute stress
848 responses in Chinese soldiers: Exploring multiple mediation model. *Psychiatry Res.*
849 256, 71–78.
- 850 Cho, J.H., Park, C.B., Yoon, Y.G., Kim, S.C., 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich
851 antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular
852 characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1408, 67–76.

- 853 Ciğerci, İ.H., Ali, M.M., Kaygısız, Ş.Y., Liman, R., 2016. Genotoxicity assessment of
854 cobalt chloride in *Eisenia hortensis* earthworms coelomocytes by comet assay and
855 micronucleus test. *Chemosphere*. 144, 754–757.
- 856 Cossarizza, A., Cooper, E.L., Suzuki, M.M., Salvioli, S., Capri, M., Gri, G., Quaglino,
857 D., Franceschi, C., 1996. Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react
858 with several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Exp. Cell. Res.* 224, 174–
859 182.
- 860 Costa, F., Dornelles, E., Mânica-Cattani, M.F., Algarve, T.D., Filho, O.C.S., Sagrillo,
861 M.R., Garcia, L.F.M., da Cruz, I.B.M., 2012. Influence of Val16Ala SOD2
862 polymorphism on the *in-vitro* effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism.
863 *Reprod. Biomed. Online*. 24, 474–481.
- 864 Csoknya, M., Dénes, V., Wilhelm, M., 2012. Glial cells in the central nervous system of
865 earthworm, *Eisenia fetida*. *Acta Biol. Hung.* 63, 114–128.
- 866 dos Santos Montagner, G.F., Sagrillo, M., Machado, M.M., Almeida, R.C.,
867 Mostardeiro, C.P., Duarte, M.M., da Cruz, I.B., 2010. Toxicological effects of
868 ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide
869 dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. In Vitro*. 24, 1410–1416.
- 870 Duarte, M.M., Moresco, R.N., Duarte, T., Santi, A., Bagatini, M.D., Da Cruz, I.B.,
871 Schetinger, M.R., Loro, V.L., 2010. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its
872 association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin Biochem.*
873 43, 1118–1123.
- 874 Duarte, T., da Cruz, I.B.M., Barbisan, F., Capelleto D., Moresco, R.N., Duarte,
875 M.M.M.F., 2016. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory,

- 876 antioxidant and fibrinolytics blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide
877 dismutase manganese-dependent gene polymorphism. *Pharmacogenomics J.* 16, 501–
878 506.
- 879 Engelmann, P., Hayashi, Y., Bodó, K., Ernszt, D., Somogyi, I., Steib, A., Orbán, J.,
880 Pollák, E., Nyitrai, M., Németh, P., Molnár, L., 2016. Phenotypic and functional
881 characterization of earthworm coelomocyte subsets: Linking light scatter-based cell
882 typing and imaging of the sorted populations. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 41–52.
- 883 Engelmann, P., Pálincás, L., Cooper, E.L., Németh, P., 2005. Monoclonal antibodies
884 identify four distinct annelid leukocyte markers. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 599–614.
- 885 Ermolaeva, M.A., Schumacher, B., 2014. Insights from the worm: the *C. elegans* model
886 for innate immunity. *Semin. Immunol.* 26, 303–309.
- 887 Fan, Y., Mu, Y., Lu, L., Tian, Y., Yuan, F., Zhou, B., Yu, C., Wang, Z., Li, X., Lei, S.,
888 Xu, Y., Wu, D., Yang, L., 2019. Hydrogen peroxide-inactivated bacteria induces potent
889 humoral and cellular immune responses and releases nucleic acids. *Int.*
890 *Immunopharmacol.* 69, 389–397.
- 891 Galecki, P., Smigielski, J., Florkowski, A., Bobińska, K., Pietras, T., Szemraj, J., 2010.
892 Analysis of two polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene (Ile-
893 58Thr and Ala-9Val) in patients with recurrent depressive disorder. *Psychiatry Res.*
894 179, 43–46.
- 895 Galecki, P., Talarowska, M., 2018. Inflammatory theory of depression. *Psychiatr. Pol.*
896 52, 437–447.
- 897 Ghosh, S., 2018. Environmental pollutants, pathogens and immune system in
898 earthworms. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 6196–6208.

- 899 Guzik, T.J., Korbust, R., Adamek-Guzik, T., 2003. Nitric oxide and superoxide in
900 inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 54, 469–487.
- 901 Halwasia, S., Dhanesha, M., Udhani, H., Deore, K., 2018. Rapid escape response - A
902 behavioral response on *Eisenia fetida*. *J. Vet. Sci. Technol.* 9, 1.
- 903 Homa, J., 2018. Earthworm coelomocyte extracellular traps: structural and functional
904 similarities with neutrophil NETs. *Cell. Tissue Res.* 371, 407–414.
- 905 Homa, J., Ortmann, W., Kolaczowska, E., 2016. Conservative mechanisms of
906 extracellular trap formation by Annelida *Eisenia andrei*: serine protease activity
907 requirement. *PLoS One.* 11, e0159031.
- 908 Jentzsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, H.K., 1996. Improved analysis of
909 malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 251–256.
- 910 Jobim, M.L., Azzolin, V.F., Assmann, C.E., Morsch, V.M.M., da Cruz, I.B.M., de
911 Freitas Bauermann, L., 2019. Superoxide-hydrogen peroxide imbalance differentially
912 modulates the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism via Keap1-Nrf2
913 redox signaling pathway. *Mol. Biol. Rep.* 46, 5785–5793.
- 914 Johnson, M.E., Bobrovskaya, L., 2015. An update on the rotenone models of
915 Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model
916 gene-environment interactions. *Neurotoxicology.* 46, 101–116.
- 917 Jung, I.E.C., da Cruz, I.B.M., Barbisan, F., Trott, A., Houenou, L.J., Osmarin Turra, B.,
918 Duarte, T., de Souza Praia, R., Maia-Ribeiro, E.A., da Costa Escobar Piccoli, J., Bica,
919 C.G., Duarte, M.M.M.F., 2019. Superoxide imbalance triggered by Val16Ala-SOD2
920 polymorphism increases the risk of depression and self-reported psychological stress in
921 free-living elderly people. *Mol. Genet. Genomic Med.* e1080.

- 922 Kalinichenko, L.S., Kornhuber, J., Müller, C.P., 2019. Individual differences in
923 inflammatory and oxidative mechanisms of stress-related mood disorders. *Front.*
924 *Neuroendocrinol.* 55, 100783.
- 925 Liu, D.W., Fairweather-Schmidt, A.K., Burns, R., Roberts, R.M., Anstey, K.J., 2016.
926 Psychological resilience provides no independent protection from suicidal risk. *Crisis.*
927 37, 130–139.
- 928 Machado, A.K., Andreazza, A.C., da Silva, T.M., Boligon, A.A., do Nascimento, V.,
929 Scola, G., Duong, A., Cadoná, F.C., Ribeiro, E.E., da Cruz, I.B., 2016. Neuroprotective
930 effects of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against rotenone *in vitro* exposure. *Oxid. Med.*
931 *Cell. Longev.* 2016, 8940850.
- 932 McDaniel, J.P., Barbarick, K.A., Stromberger, M.E., Cranshaw, W., 2013. Survivability
933 of *Aporrectodea caliginosa* in response to drought stress in a Colorado soil. *Soil Sci.*
934 *Soc. America J.* 77, 1667–1672.
- 935 Mo, X., Qiao, Y., Sun, Z., Sun, X., Li, Y., 2012. Molecular toxicity of earthworms
936 induced by cadmium contaminated soil and biomarkers screening. *J. Environ. Sci.*
937 (China). 24, 1504–1510.
- 938 Montano, M.A., da Cruz, I.B., Duarte, M.M., da Costa Krewer, C., da Rocha, M.I.,
939 Mânica-Cattani, M.F., Soares, F.A., Rosa, G., Maris, A.F., Battiston, F.G., Trott, A.,
940 Lera, J.P., 2012. Inflammatory cytokines *in vitro* production are associated with
941 Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear
942 cells. *Cytokine.* 60, 30–33.
- 943 Münzel, T., Daiber, A., 2018. Environmental stressors and their impact on health and
944 disease with focus on oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 735–740.

- 945 Nakashima, T., Mushiake, H., Sakamoto, K., 2018. Earthworm individualities when
946 facing a conflict between turn alternation and aversive learning. *Biophys. Physicobiol.*
947 15, 159–164.
- 948 Nauseef, W.M., Borregaard, N., 2014. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.* 15, 602–
949 611.
- 950 Otvos, L. Jr., 2016. Immunomodulatory effects of anti-microbial peptides. *Acta*
951 *Microbiol. Immunol. Hung.* 63, 257–277.
- 952 Pietras, T., Witusik, A., Panek, M., Gałeczki, P., Szemraj, J., Górski, P., 2010. Anxiety,
953 depression and polymorphism of the gene encoding superoxide dismutase in patients
954 with chronic obstructive pulmonary disease. *Pol. Merkur Lekarski.* 29, 165–168.
- 955 Roeben, V., Oberdoerster, S., Capowiez, Y., Ernst, G., Preuss, G., T., Gergs, A.,
956 Obersoerster, C., 2020. Towards a spatiotemporally explicit toxicokinetic-
957 toxicodynamic model for earthworm toxicity. *Sci Total Environ.* 722.
- 958 Satake, H., Sekiguchi, T., 2012. Toll-like receptors of deuterostome invertebrates.
959 *Front. Immunol.* 3, 34.
- 960 Schott, K.L., Assmann, C.E., Barbisan, F., Azzolin, V.F., Bonadiman, B., Duarte,
961 M.M.M.F., Machado, A.K., da Cruz, I.B.M., 2017. Superoxide-hydrogen peroxide
962 genetic imbalance modulates differentially the oxidative metabolism on human
963 peripheral blood mononuclear cells exposed to seleno-L-methionine. *Chem. Biol.*
964 *Interact.* 273, 18–27.
- 965 Schott, K.L., Assmann, C.E., Teixeira, C.F., Boligon, A.A., Waechter, S.R., Duarte,
966 F.A., Ribeiro, E.E., da Cruz, I.B.M., 2018. Brazil nut improves the oxidative

- 967 metabolism of superoxide-hydrogen peroxide chemically-imbalanced human fibroblasts
968 in a nutrigenomic manner. *Food Chem. Toxicol.* 121, 519–526.
- 969 Scola, G., Kim, H.K., Young, L.T., Salvador, M., Andreatza, A.C., 2014. Lithium
970 reduces the effects of rotenone-induced complex I dysfunction on DNA methylation and
971 hydroxymethylation in rat cortical primary neurons. *Psychopharmacology (Berl)*. 231,
972 4189–4198.
- 973 Shi, Z., Tang, Z., Wang, C., 2017. A brief review and evaluation of earthworm
974 biomarkers in soil pollution assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24, 13284–
975 13294.
- 976 Shimano, C., Hara, M., Nishida, Y., Nanri, H., Horita, M., Yamada, Y., Li, Y.S.,
977 Kasai, H., Kawai, K., Higaki, Y., Tanaka, K., 2018. Perceived stress, depressive
978 symptoms, and oxidative DNA damage. *Psychosom. Med.* 80, 28–33.
- 979 Škanta, F., Roubalová, R., Dvořák, J., Procházková, P., Bilej M., 2013. Molecular
980 cloning and expression of TLR in the *Eisenia andrei* earthworm. *Dev. Comp. Immunol.*
981 41, 694–702.
- 982 Slavich, G.M., Irwin, M.R., 2014. From stress to inflammation and major depressive
983 disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychol. Bull.* 140, 774–815.
- 984 Subaraja, M., Vanisree, A.J., 2016. Rotenone causing dysfunctional mitochondria and
985 lysosomes in cerebral ganglions of *Lumbricus terrestris* degenerate giant fibers and
986 neuromuscular junctions. *Chemosphere.* 152, 468–80.
- 987 Subaraja, M., Vanisree, A.J., 2019. Counter effects of Asiaticosides-D through putative
988 neurotransmission on rotenone induced cerebral ganglionic injury in *Lumbricus*
989 *terrestris*. *IBRO Rep.* 6, 160–175.

- 990 Syed, Z., Alexander, D., Ali, J., Unrine, J., Shoults-Wilson, W.A., 2017. Chemosensory
991 cues alter earthworm (*Eisenia fetida*) avoidance of lead-contaminated soil. Environ.
992 Toxicol. Chem. 36, 999–1004.
- 993 Thomas, D.C., 2017. The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives and recent
994 advances. Immunol. Lett. 192, 88–96.
- 995 Valembois, P., Lassègues, M., Roch, P., 1992. Formation of brown bodies in the
996 coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape
997 and adhesive capacity of constitutive cells. Dev. Comp. Immunol. 16, 95–101.
- 998 Vidya, M.K., Kumar, V.G., Sejian, V., Bagath, M., Krishnan, G., Bhatta, R., 2018. Toll-
999 like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. Int
1000 Rev Immunol. 37, 20–36.
- 1001 Viswanath, B., Jose, S.P., Squassina, A., Thirthalli, J., Purushottam, M., Mukherjee, O.,
1002 Vladimirov, V., Patrinos, G.P., Del Zompo, M., Jain, S., 2015. Cellular models to study
1003 bipolar disorder: A systematic review. J. Affect. Disord. 184, 36–50.
- 1004 Wehr, N.B., Levine, R.L., 2013. Quantification of protein carbonylation. Methods Mol.
1005 Biol. 965, 265–281.
- 1006 Wigner, P., Czarny, P., Synowiec, E., Bijak, M., Białek, K., Talarowska, M., Galecki,
1007 P., Szemraj, J., Sliwinski, T., 2018. Variation of genes involved in oxidative and
1008 nitrosative stresses in depression. Eur. Psychiatry. 48, 38–48.
- 1009 Wilson, W.J., Ferrara, N.C., Blaker, A.L., Giddings, C.E., 2014. Escape and avoidance
1010 learning in the earthworm *Eisenia hortensis*. Peer J. 2, e250.

1011 Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., Hampton, M.B., 2016. Reactive oxygen species and
1012 neutrophil function. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 765–792.

1013 Zirbes, L., Brostaux, Y., Mescher, M., Jason, M., Haubruge, E., Deneubourg, J.L.,
1014 2012. Self-assemblage and quorum in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaete,
1015 Lumbricidae). *PLoS One.* 7(3), e32564.

1016

Journal Pre-proof

Highlights

Superoxide-hydrogen peroxide imbalance in human influence the risk of depression

Low basal Superoxide-anion levels associated the stress response and with resilience

Earthworms were exposed to rotenone, which generates high levels of Superoxide anion

Superoxide-anion imbalance induce alterations in immune function and stress behavior

Results help to understand the role superoxide in stress, resilience and depression

Journal Pre-proof

4 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou se o desbalanço genético ou farmacológico S-HP associado a estados pró-inflamatórios poderia afetar o risco de baixa resiliência ao estresse psicocomportamental. Para tanto foram conduzidas três investigações, duas em seres humanos e uma utilizando o modelo experimental minhoca californiana vermelha. Em humanos foi testado o papel do desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio genético

Os resultados sugeriram influência deste desbalanço nesta modulação já que: (1) níveis basais alterados do ânion superóxido associados ao genótipo VV aumentaram o risco de depressão e de autopercepção de estresse psicossocial em idosos; (2) adultos jovens sem histórico de estresse crônico portadores do genótipo VV apresentavam alterações nas concentrações de moléculas associadas ao estresse do eixo HPA, especialmente níveis mais elevados de cortisol. Estes sujeitos também apresentavam concentrações menores da molécula neurogênica BDNF; (3) em minhocas, a exposição da rotenona que gerou um fenótipo VV-like induziu alterações no padrão das células inflamatórias e diminuição na eficiência da resposta antimicrobiana, provavelmente envolvendo a redução na expressão dos genes EaRTL e AMP; (4) o fenótipo VV-like também induziu alterações na resposta comportamental quando as minhocas foram expostas a duas condições de estresse hídrico.

Antes de serem discutidos os aspectos específicos destes resultados é importante que sejam feitas algumas considerações relacionadas a associação entre estresse psicossocial crônico, inflamação crônica e transtornos psiquiátricos. Estudos epidemiológicos em grande escala mostraram que o estresse, tanto na infância quanto na vida adulta, predispõe ao desenvolvimento de problemas de saúde mental na idade adulta (SCOTT et al. 2012 ; VARESE et al. 2012 ; BENJET et al. 2010 ; KESSLER et al. al. 2010). Calcia e Colaboradores (2016), citam que várias hipóteses, incluindo alterações no sistema HPA, respostas imunológicas anormais e mudanças nas formas celulares, moleculares e epigenéticas de plasticidade, para explicar as vias neurobiológicas que ligam estresse a doenças mentais.

Ainda, já foi relatado que experiências de vida estressantes estão associadas a citocinas pró-inflamatórias elevadas na infância e também estão associadas ao alto risco de doença mental na idade adulta (KHANDAKER et al. 2014) Essas elevações de citocinas podem induzir alterações na microglia cortical, que por sua vez podem estar associadas a alterações estruturais e funcionais no cérebro que predispõem os indivíduos à doença mental (CALCIA et al., 2016).

O conjunto destes resultados corrobora a hipótese de que que, o desbalanço oxidativo basal poderia ser um elemento sinalizador basal no sistema imune e do eixo HPA produzindo um

estado fisiológico, que produziria um estado, não só “pró-inflamatório”, mas também, “pró-estresse” (*infla-stress responsive states*). Ou seja, na presença de agentes estressores, níveis mais elevados do ânion superóxido contribuiriam para o estabelecimento de um estado inflamatório crônico e, concomitantemente uma maior responsividade ao estresse. Assim, o estado pró-infla-estresse poderia aumentar a percepção de exposição a exposição do estresse psicossocial e também o risco de transtornos psiquiátricos, em especial a depressão.

O estresse psicossocial crônico é considerado um dos elementos chaves no desencadeamento de transtornos psiquiátricos sendo também fator de risco para diversas DCNTs. Uma das possíveis ligações entre o estresse psicossocial e o desenvolvimento da depressão envolve estresse oxidativo associado a inflamação crônica de baixo grau (a chamada “inflamação estéril”). Como não está claro se, alterações oxidativas basais poderiam ampliar o efeito negativo do estresse o presente estudo se dedicou a avaliar esta possibilidade através de uma abordagem translacional envolvendo investigações em seres humanos e em minhocas californianas utilizadas como modelo experimental. A escolha destes dois modelos de estudo foi baseada em investigações anteriores que relataram associação entre o polimorfismo Val16Ala-SOD2, que causa desbalanço S-HP e risco de depressão (WIGNER et al., 2018). Assim foram conduzidas duas análises epidemiológicas envolvendo o desbalanço genético Val16Ala-SOD2 e um estudo experimental envolvendo desbalanço farmacológico S-HP em minhocas via exposição a rotenona e a porfirina.

O primeiro estudo caso-controle observou associação significativa entre o genótipo VV, risco de depressão e maior frequência de autopercepção de estresse psicossocial em idosos. No segundo estudo foi observado níveis basais alterados em marcadores do estresse do eixo HPA, onde adultos saudáveis, sem histórico de estresse emocional crônico ou transtorno psiquiátrico que eram portadores do genótipo VV apresentaram níveis elevados de cortisol e diminuídos de ACTH, DHEA e BDNF em comparação aos portadores do alelo-A.

Uma vez que, o polimorfismo Val16Ala-SOD2 tem sido consistentemente associado com alterações em marcadores inflamatórios (MONTANO et al., 2009; DUARTE et al., 2010; DUARTE et al., 2016; BARBISAN et al., 2017), o efeito do desbalanço farmacológico S-HP em minhocas foi avaliado através da análise da eficiência da resposta imune destes animais, quando expostos a microorganismos e através de alterações no padrão comportamental quando as minhocas foram submetidas a condições de estresse que poderiam afetar a sua sobrevivência. Nas das análises realizadas o aumento nos níveis do ânion S, via exposição da rotenona alterou o padrão das células inflamatórias, diminuiu a eficiência antimicrobiana e também alterou o comportamento de sobrevivência. O conjunto destes resultados corrobora a ideia de que um

desbalanço prévio, principalmente nos níveis do ânion superóxido poderia ser um elemento de ligação entre a inflamação crônica, estresse psicossocial e depressão maior.

A seguir serão discutidos os aspectos mais relevantes destes três estudos, fatores metodológicos limitantes e o potencial uso destas informações no desenvolvimento de estratégias que poderiam atenuar o impacto do desbalanço oxidativo sobre alterações neuropsiquiátricas.

Considerando o primeiro estudo, cujo o objetivo foi analisar a potencial associação entre auto-relato de estresse crônico e depressão de idosos da comunidade de vida livre e um polimorfismo genético que causa um desequilíbrio basal nos níveis de S-HP. Os resultados até aqui obtidos mostraram que o idosos portadores do genótipo VV, que tem níveis basais de superóxido mais elevados do que aqueles com genótipos que contêm o alelo A (AA e AV), aumentaram o risco de depressão, ou seja sugerindo uma maior tendência..

A associação entre VV-SOD2 e depressão pode ser epidemiologicamente relevante, considerando dados da Pesquisa Mundial de Saúde Mental realizada em 17 países, estimando a ocorrência de pelo menos um episódio de depressão ao longo da vida, em 1 a cada 20 pessoas (WHO, 2012). A depressão é considerado um transtorno que afeta um grande número de pessoas, especialmente idosos, nos EUA, a depressão tardia afeta cerca de 3,0 a 4,5% dos adultos com 65 anos ou mais (WANG e BLAZER, 2015). No entanto, a depressão é um transtorno multifacetado com diversas causas, e o conhecimento sobre os seus mecanismos patogênicos ainda é limitado. Evidências sugerem que o estresse crônico psicológico é um risco direto e crucial associado ao desenvolvimento da depressão, uma vez que está implicado na indução de múltiplas alterações comportamentais, neuroquímicas e biológicas (TAGLIARI et al., 2010).

Está bem documentado que o estresse psicossocial crônico está associado à superprodução de EROs e à patogênese da depressão, e estudos têm consistentemente relatado níveis mais altos de EROs no sangue periférico de pacientes com depressão (BLICI et al., 2001; LUKASH et al., 2002; MICHEL et al., 2007; Wei et al., 2009). Além disso, existem algumas investigações, como as realizadas por Maes et al (2011) que relataram associação entre depressão e comprometimento do estado antioxidante.

Payne e colaboradores (2012), realizaram um estudo que avaliou as associações transversais entre depressão clinicamente diagnosticada e ingestão de antioxidantes, frutas e vegetais em uma coorte de idosos. A ingestão de antioxidantes, frutas e verduras foi avaliada em 278 idosos (144 com depressão, 134 sem depressão) usando um questionário de frequência alimentar. Os resultados demonstraram que a ingestão de antioxidantes como vitamina C e

luteína foi significativamente menor entre os indivíduos com depressão do que nos participantes controle. Além disso, o consumo de frutas e vegetais, um dos principais determinantes da ingestão de antioxidantes, foi menor em indivíduos com depressão.

Entretanto, antes de discutirmos os resultados encontrados, é importante ressaltar que optamos por avaliar apenas idosos da comunidade de vida livre, pois esses grupos etários provavelmente experimentaram previamente situações de “perda”, incluindo a morte de um familiar ou amigo, *status* social e perdas funcionais. Assim, os idosos que não apresentam algum tipo de depressão ou sintoma depressivo mais proeminente podem ser considerados mais resilientes, enquanto o grupo dos deprimidos pode ser considerado muito mais variável. Claro que excluímos da nossa análise idosos com declínio cognitivo importante e também DCNTs prévias, que poderiam predispor a estados depressivos. Entre essas doenças estão algumas morbidades neurodegenerativas, como Parkinson, doenças coronarianas como infarto do miocárdio, e câncer.

Outra questão que precisa ser comentada é em relação ao diagnóstico de depressão que foi realizado aqui utilizando o instrumento GDS. De fato, o diagnóstico preciso é essencial para o manejo da depressão em idosos na atenção primária. Por essa razão, várias escalas foram desenvolvidas, incluindo GDS, Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (HADS) e Entrevista Clínica Estruturada para os critérios do DSM-V. No entanto, um estudo recente mostrou a existência de altos níveis de discordância do diagnóstico de depressão realizados por diferentes instrumentos, quando mais de 1000 paciente com 75 anos ou mais foram avaliados concomitantemente com essas escalas. Apesar das diferenças, a GDS foi a ferramenta que mais se aproximou da prevalência de depressão diagnosticada por um médico generalista baseado no DSM-V. Considerando a avaliação do médico, estimou-se em 24,3% o percentual de idosos depressivos, já via o GDS o percentual ficou em 21,8% (DOROW et al., 2017). Além disso, a GDS foi previamente validada no Brasil e é amplamente utilizada nas anamneses geriátricas para triagem e diagnóstico de depressão (ALMEIDA e ALMEIDA, 2014).

No entanto, existem algumas considerações que precisam ser comentadas sobre a ferramenta GDS. Na verdade, muitos instrumentos estão disponíveis para medir a depressão, incluindo GDS com 30 perguntas, primeiro criado por Yesavage et al (1983), que foi testado e usado extensivamente com idosos. O formulário GDS curto, estruturado em 1986, apresenta 15 questões, 10 questões indicam a presença de depressão quando respondidas positivamente, enquanto cinco questões indicam depressão, quando respondidas negativamente. Quando a GDS-15 foi criada, indivíduos mais velhos com pontuação 0-4 foram considerados não-depressivos. Idosos com 5 a 8 anos foram considerados com depressão leve; 9-11 indicaram

depressão moderada; e 12-15 indicam depressão grave. No entanto, alguns autores como Greenberg (2012) comentaram que, esses pontos de corte poderiam depender de idade, escolaridade e queixas. Por esta razão, geralmente a escala GDS é utilizada como ferramenta de triagem para identificar pessoas idosas depressivas, mas não a intensidade desta condição psiquiátrica.

Retomando os resultados iniciais desta investigação, a potencial associação entre o genótipo VV, é importante ressaltar que investigações envolvendo o seu SNP e condições psiquiátricas e psicológicas ainda são incipientes e controversas. A partir da literatura, encontramos três investigações prévias que sugeriram alguma associação entre depressão e genótipo VV (GAŁECKI et al., 2010; PIETRAS et al., 2010; WIGNER et al., 2018). Outros estudos envolvendo associação potencial entre o SNP Val16Ala-SOD2 e os transtornos de humor não mostraram associação significativa entre o SNP e transtorno depressivo maior e / ou transtorno bipolar. No entanto, os autores consideraram que o estudo foi realizado com uma pequena amostra (PAE et al., 2006; CUMURCU et al., 2013).

De fato, há dificuldades em estabelecer estudos de associação envolvendo o metabolismo oxidativo genético, uma vez que existem vários fatores intervenientes potenciais que poderiam atuar como atenuadores ou potencializadores do estresse oxidativo associado aos transtornos psiquiátricos. Por esse motivo, procuramos realizar uma seleção prévia de nossa amostra, considerando a exclusão de idosos que apresentassem *déficit* cognitivo, fragilidade física e psicológica e DCNTs não compensadas/controladas. Nestes termos, optou-se por investigar a possível associação entre a depressão da comunidade idosa de vida livre que participava de grupos de idosos organizados.

Apesar das dificuldades em avaliar o impacto do desequilíbrio oxidativo basal no risco de depressão em idosos, os resultados aqui relatados estão de acordo com uma recente investigação publicada por Wigner et al (2017) entre Val16AlaSOD SNP (rs4880) e depressão em adultos. Similarmente observado em idosos estudados aqui, os portadores do genótipo VV apresentaram maior risco de diagnóstico de depressão do que os indivíduos AA e AV.

Pae e colaboradores (2006), avaliaram a relação entre o polimorfismo Val16Ala-SOD2 e transtorno bipolar (80 pacientes) e com depressão maior (61 pacientes), e ainda 106 controles saudáveis foram incluídos neste estudo. Todos os participantes dos 3 grupos tiveram uma distribuição similar dos genótipos e alelos no polimorfismo, a análise combinada de ambos os transtornos avaliados também não conseguiu encontrar qualquer associação entre o polimorfismo e os transtornos de humor. Sugerindo assim, que na população coreana, o polimorfismo Val16Ala-SOD2, não está associado ao desenvolvimento de transtornos de

humor ou seus parâmetros clínicos. No entanto, os próprios autores recomendam a realização de mais estudos com uma amostra populacional maior, uma vez que estes dados podem não representar a realidade devido ao baixo número de avaliados. Já, Cumurcu e colaboradores (2013), realizaram estudo com a população da Turquia em que investigaram a relação do polimorfismo Val 16 Ala-SOD2 transtorno depressivo maior e transtorno bipolar I. Foram incluídos no estudo pacientes diagnosticados com os respectivos transtornos, sendo 80 com transtorno depressivo maior e 82 com transtorno bipolar, e ainda 96 controles saudáveis. Os resultados não apontaram para diferenças significativas entre genótipos que pudessem apontar alguma associação. Os próprios autores citam que uma das limitações do estudo é que o tamanho da amostra ser muito pequeno.

Na verdade, investigações prévias realizadas com o Val16Ala-SOD2 descreveram que o genótipo VV estava associado à inflamação crônica (MONTANO et al., 2012; BARBISAN et al., 2017) e ao risco de morbidades metabólicas, como a obesidade (MONTANO et al., 2012), dislipidemias (DUARTE et al., 2010; 2016) e complicações da doença cardiovascular (FUJIMOTO et al., 2010; SOUIDEN et al., 2016). Dois estudos independentes também descreveram que o polimorfismo Val16Ala-SOD2 está relacionado à modulação diferencial do LDL-oxidado, com o genótipo VV associado a níveis mais elevados dessa importante molécula pró-aterogênica (GOTTLIEB et al., 2005; FUJIMOTO et al., 2010).

Ressalta-se que 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).

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 sendo essa uma resposta adaptativa importante para o organismo (WRIGHT et al., 2005). No entanto, quando a inflamação torna-se crônica pode levar ao desenvolvimento de diversas DCNTs, como os transtornos psiquiátricos.

Investigações complementares de modelos baseadas no desequilíbrio da S-HP poderiam nos ajudar a entender melhor essa relação, sem a interferência de fatores ambientais como estilo de

vida. O desequilíbrio *in vitro* de S-HP foi criado previamente para entender seu papel na progressão do câncer de próstata e colorretal, ou resistência quimioterápica (BERTO et al., 2015; AZZOLIN et al., 2016). Talvez, a exposição crônica ao cortisol em CMSPs humanas e também em células neurais e da microglia, previamente submetidas a um desequilíbrio farmacológico S-PH, pudesse ajudar a esclarecer o papel patogênico do superóxido.

Em relação aos resultados secundários deste estudo, houve associação entre idosos com depressão e hipertensão e entre depressão e polifarmácia. De fato, estudos epidemiológicos têm descrito que a hipertensão, assim como a doença arterial coronariana e o diabetes *mellitus* tipo 2, são acompanhados por uma alta incidência de depressão e podem afetar o tratamento e o prognóstico dos idosos (Zhang et al., 2017). Especialmente em relação à prevalência de depressão em pacientes hipertensos, uma revisão sistemática e metanálise realizada por Li et al (2015) sugeriu que a depressão afeta aproximadamente um terço dos pacientes hipertensos. Portanto, a associação significativa e independente entre depressão e hipertensão encontrada aqui pode ser esperada, embora essa associação não tenha sido afetada pelo polimorfismo Val16Ala-SOD2.

Considerando que a associação entre risco de depressão e autopercepção de estresse psicossocial com o polimorfismo Val16Ala-SOD2 seja verdadeira, seria possível postular que indivíduos portadores do genótipo VV poderiam apresentar alterações em componentes fisiológicos relacionados a resposta ao estresse do eixo HPA, mesmo sendo jovens e saudáveis. Com base nesta consideração é que foi organizado o segundo estudo deste trabalho. Portadores do genótipo VV apresentaram níveis plasmáticos elevados de cortisol e baixos dos demais marcadores incluindo o BDNF. Estes resultados foram considerados relevantes porque parece que o desbalanço S-HP tem a capacidade de modular o eixo HPA e também influenciar a produção de marcadores de neurogênese e função neurocognitiva como é o caso do BDNF.

Investigações têm descrito que os níveis de BDNF assim como o do cortisol são influenciados pelo período circadiano (41,42), estando mais altos pela manhã. Entretanto se estes níveis são muito elevados, principalmente em decorrência do estresse esta situação pode ter impacto negativo sobre a saúde física e mental. Existem estudos que descreveram relação inversa entre os níveis de cortisol e BDNF em alguns transtornos psiquiátricos como é o caso da esquizofrenia, mulheres com histórico de tentativa de suicídio e depressão.

O número limitado de indivíduos investigados no segundo estudo foi uma fragilidade metodológica que não pode ser resolvida por questões logísticas, de limitação de tempo, recursos econômicos. Além disto, por ser tratar de seres humanos outras variáveis genético-ambientais poderiam influenciar os resultados obtidos. Por este motivo é que foi concebido o

desenvolvimento de um modelo experimental *in vivo* de desbalanço farmacológico S-HP. Esta ideia foi baseada em estudos que descreveram modelos experimentais *in vitro* em células cancerosas (BERTO et al., 2015; AZZOLIN et al., 2016) e saudáveis (JOBIM et al., 2019).

Considerando que a maioria dos imunologistas em todo o mundo está focada na imunologia de mamíferos ou particularmente humana, pode parecer surpreendente que invertebrados - e entre outras minhocas - tenham sido um modelo experimental importante desde o início da imunologia. Sobre esta questão, Bilej et al (2013) que fizeram uma revisão geral da imunologia de minhocas destacaram que “fagocitose, um mecanismo de defesa importante e evolutivamente conservado da imunidade inata, foi descoberta no final de 1800 por Elie Mechnikoff, ganhador do Prêmio Nobel, enquanto estudava a origem dos órgãos digestivos nas larvas flutuantes da estrela do mar.”

De fato, invertebrados têm evoluído por centenas de milhões de anos, muitas vezes sobrevivendo em ambientes muito hostis. Acredita-se que as estratégias de sobrevivência bem-sucedidas provavelmente se baseiam em uma vida curta, combinada com uma prole numerosa. Mesmo tendo vida curta, espécies como a minhoca desenvolveram uma variedade de mecanismos de defesa, reconhecendo e respondendo com eficiência a substâncias não-próprias. (LITTLE et al., 2005). Mecanismos celulares de imunidade invertebrada inata incluem reparo de feridas, respostas de coagulação e coagulação, fagocitose de microrganismos invasores e reações de encapsulação (BILEJ et al., 2013).

Neste contexto, o uso de minhocas para testar a influência do desbalanço farmacológico superóxido-peróxido de hidrogênio na resposta imune é justificado. Como é muito difícil esclarecer se o processo inflamatório associado ao desbalanço superóxido-peróxido de hidrogênio poderia preceder mudanças neuropatológicas e o desenvolvimento de algumas DCNTS, o uso da minhoca pode ser considerado relevante. Assim como Gałeckí et al. (2010), Pietras et al (2010) e Wigner et al. (2018), resultados obtidos primeiro estudo deste trabalho (JUNG et al., 2019) sugeriram associação entre o genótipo VV, que possuem níveis basais do ânion-superóxido mais elevados, com risco de depressão. No primeiro estudo realizado neste trabalho também foi observado e maior frequência de autopercepção de estresse psicoemocional em idosos. O segundo estudo também sugeriu que, os níveis basais do ânion superóxido poderiam influenciar as concentrações plasmáticas matinais do cortisol, que estariam mais elevadas do que os adultos saudáveis portadores do alelo-A.

Se esta associação em que o desbalanço oxidativo S-HP poderia desencadear um estado pró-inflamatório, que por sua vez, ou concomitante poderia gerar um estado “pré-estresse” é real, seria esperado que, mesmo em um animal simples como a minhoca estas

condições também fossem observadas. De fato, elevação nos níveis do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio ocorrem quando uma resposta inflamatória é desencadeada. Estes EROs funcionam como moléculas sinalizadoras. No caso do superóxido, esta molécula tem um papel na regulação de todas as etapas da resposta imune via diferentes mecanismos (THOMAS, 2017). Como o ânion superóxido tem uma meia-vida relativamente curta ele é rapidamente degradado em peróxido de hidrogênio, que consegue através a membrana mitocondrial e migrar para o citoplasma. O superóxido também pode reagir com o óxido nítrico, produzindo peróxido nitrito que é uma molécula que pode gerar oxidação de macromoléculas, em especial os lipídios (causando lipoperoxidação) (THOMAS, 2017).

5 CONCLUSÃO/ CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

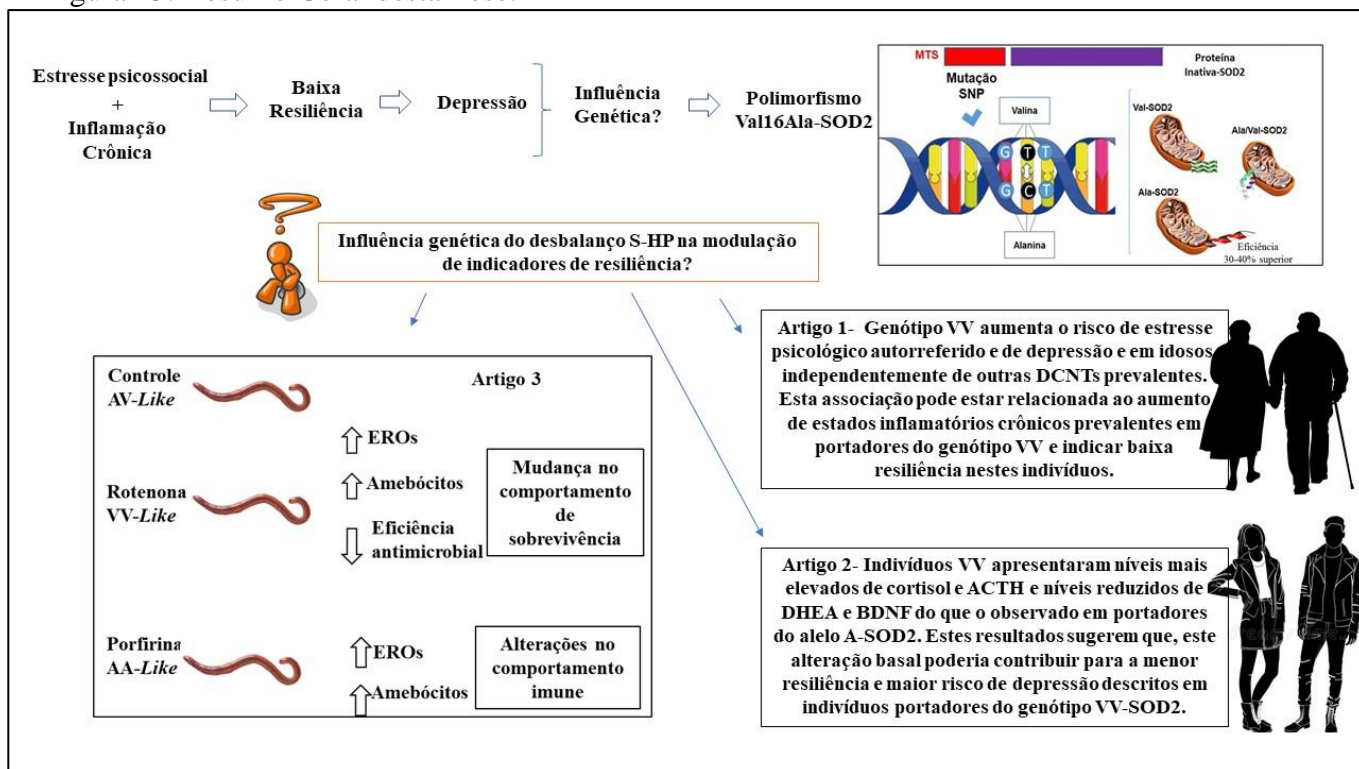
- O genótipo VV do polimorfismo Val16Ala-SOD2 aumenta o risco de estresse psicológico autorreferido e de depressão e em idosos, independentemente de outras DCNTs prevalentes. Essa associação também parece influenciar a ingestão diária de medicamentos prescritos por indivíduos mais velhos. Considerando as evidências anteriores, esta associação pode estar relacionada ao aumento de estados inflamatórios crônicos prevalentes em portadores do genótipo VV e indicar baixa resiliência nestes indivíduos.
- O desbalanço genético S-HP influencia os níveis basais de moléculas do eixo HPA associadas a resposta ao estresse e do fator neurotrófico BDNF em adultos jovens sem história prévia de transtornos psiquiátricos e outras enfermidades. No caso, indivíduos VV apresentaram níveis mais elevados de cortisol e ACTH e níveis reduzidos de DHEA e BDNF do que o observado em portadores do alelo A-SOD2. Estes resultados sugerem que, esta alteração basal poderia contribuir para a menor resiliência e maior risco de depressão descritos em indivíduos portadores do genótipo VV-SOD2.
- O desbalanço S-HP farmacologicamente induzido em minhocas *E.fetida* produziu alterações oxidativas, no estado de imunocompetência do animal e em comportamentos associados a sobrevivência. No caso, minhocas VV-like apresentaram padrões que indicam ativação inflamatória associada a comportamentos que potencialmente levariam a morte do animal sugerindo um padrão comportamental similar a baixa resiliência observada nos seres humanos portadores do genótipo VV-SOD2.

O conjunto de resultados aqui apresentados sugere que estados pró-oxidativos e pró-inflamatórios podem predispor a baixa resiliência em situações de estresse e ao desenvolvimento da depressão. Parece que tal associação não é limitada a seres humanos e pode ser encontrada em animais evolutivamente primitivos como é o caso das minhocas.

Embora nossos resultados ainda necessitem de estudos complementares para elucidar possíveis mecanismos, é possível inferir que o uso das informações aqui descritas poderão futuramente auxiliar no desenvolvimento de estratégias farmacológicas e não-farmacológicas (psicoterápicas) que aumentem a resiliência a eventos estressores e melhorem o manejo da depressão de pacientes portadores do genótipo VV-SOD2.

Apresentamos abaixo, a figura 23, que resume esta tese.

Figura 23: Resumo Geral desta Tese.



Fonte: Elaborada pelo autor

6 REFERÊNCIAS

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(4), p.5134-5144, 2013.

ADAM, E.K.; KUMARI, M. **Assessing salivary cortisol in large-scale, epidemiological research.** Psychoneuroendocrinology, v.34(10), p.1423-1436, 2009.

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.

ANDREESCU, C.; VARON, D. **New research on anxiety disorders in the elderly and an update on evidence-based treatments.** Current Psychiatry Reports, v.17, n.7, p. 47-53, 2015.

ALEXOPOULOS GS. **Depression in the elderly.** Lancet. 2005 Jun 4-10;365(9475):1961-70.

ASCHBACHER, K.O. et al. **Good stress, bad stress and oxidative stress: insights from anticipatory cortisol reactivity.** Psychoneuroendocrinology, v.38, n.9, p.1698–1708, 2013.

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.

AZUMA, K. et al. **Chronic Psychological Stress as a Risk Factor of Osteoporosis.** Journal of UOEH, v.37, n.4, p. 245-253, 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 Aug;20(4):334-345.

BARBISAN, F. **A ação anti-inflamatória do lítio é influenciada por fatores genéticos, nutricionais e fármacos antidepressivos: estudos in vitro.** Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, 2017.

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.

BARBISAN F, AZZOLIN VF, MONTEIRO GC, TEIXEIRA CF, MASTELLA MH, BUENO V, DUARTE MMMF, WAGNER G, DO PRADO-LIMA PAS, RIBEIRO EE, DA CRUZ IBM. **Genetic or pharmacological superoxide-hydrogen peroxide imbalances modulate the in vitro effects of lithium on glycogen synthase kinase-3 β .** Gene. 20;655:48-55, 2018.

- BARNA J, CSOKNYA M, LÁZÁR Z, BARTHÓ L, HÁMORI J, ELEKES K. **Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida).** J Neurocytol. 30(4):313-25, 2001.
- BAUER, M.E. **Chronic stress and immunosenescence: a review.** Neuroimmunomodulation, v.15, n.4-6, p.241-250, 2008.
- BAUER, M.E., TEIXEIRA, A.L. **Inflammation in psychiatric disorders: what comes first?** Annals of the New York Academy of Sciences, 2018.
- 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.
- BICA, C.G. et al. **MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer.** Pathol Oncol Res.v.15, p.19-24, 2009.
- BILEJ M, PROCHÁZKOVÁ P, SILEROVÁ M, JOSKOVÁ R. **Earthworm immunity.** Adv Exp Med Biol.708:66-79, 2010.
- BLASER H, DOSTERT C, MAK TW, BRENNER D. **TNF and ROS Crosstalk in Inflammation.** Trends Cell Biol. 26(4):249-261, 2016.
- BLESSMANN, E.J. **Corporeidade e Envelhecimento: O Significado do Corpo na Velhice.** Revista Envelhecer, v.6, p.21-39, 2004.
- BLOUIN M, SERY N, CLUZEAU D, BRUN JJ, BÉDÉCARRATS A. **Balkanized research in ecological engineering revealed by a bibliometric analysis of earthworms and ecosystem services.** Environ Manage. 52(2):309-20, 2013.
- BORRAS C, INGLES M, MAS-BARGUES C, DROMANT M, SANZ-ROS J, ROMÁN-DOMÍNGUEZ A, GIMENO-MALLENCH L, GAMBINI J, VIÑA J. **Centenarians: An excellent example of resilience for successful ageing.** Mech Ageing Dev. 186:111199, 2020.
- BRESCIANI G, GONZÁLEZ-GALLEGO J, DA CRUZ IB, DE PAZ JA, CUEVAS MJ. **The Ala16Val MnSOD gene polymorphism modulates oxidative response to exercise.** Clin Biochem., 46(4-5):335-40, 2013.
- BRESCIANI G, DA CRUZ IB, GONZÁLEZ-GALLEGO J. **Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation.** Adv Clin Chem. 68:87-130, 2015.
- CALCIA MA, BONSALE DR, BLOOMFIELD PS, SELVARAJ S, BARICHELLO T, HOWES OD. **Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness.** Psychopharmacology (Berl). 233(9):1637-50, 2016.
- CALISI A, GRIMALDI A, LEOMANNI A, LIONETTO MG, DONDERO F, SCHETTINO T. **Multibiomarker response in the earthworm *Eisenia fetida* as tool for assessing multi-walled carbon nanotube ecotoxicity.** Ecotoxicology. 25(4):677-87, 2016.

- CASEY DA. **Depression in Older Adults: A Treatable Medical Condition.** Prim Care. 44(3):499-510, 2017.
- CATHOMAS F, MURROUGH JW, NESTLER EJ, HAN MH, RUSSO SJ. **Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body.** Biol Psychiatry. 86(6):410-420, 2019.
- CHEN Y, BARAM TZ. **Toward Understanding How Early-Life Stress Reprograms Cognitive and Emotional Brain Networks.** Neuropsychopharmacology. 41(1):197-206, 2016.
- CHEN C, NAKAGAWA S, AN Y, ITO K, KITAICHI Y, KUSUMI I. **The exercise-glucocorticoid paradox: How exercise is beneficial to cognition, mood, and the brain while increasing glucocorticoid levels.** Front Neuroendocrinol. 44:83-102, 2017.
- CHISHOLM D, SANDERSON K, AYUSO-MATEOS JL, SAXENA S. **Reducing the global burden of depression: population-level analysis of intervention cost-effectiveness in 14 world regions.** Br J Psychiatry. 184:393-403, 2004.
- CHIRIAC, V.F.; BABAN, A.; DUMITRASCU, D.L. **Psychological stress and breast cancer incidence: a systematic review.** Clujul Medical. v.91, n.1, p.18-26, 2018.
- COSTA F, BARBISAN F, ASSMANN CE, SEEHABER AD, DUARTE MHMT, DUARTE MMMF, CRUZ IBMD. **Influence of Val16Ala-SOD2 polymorphism on sperm quality parameters.** Hum Fertil (Camb);21(3):212-219, 2018.
- 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 clomiphene citrate in oxidative metabolism.** *Reprod Biomed Online.* 24(4):474-481, 2012.
- CSOKNYA M, DÉNES V, WILHELM M. **Glial cells in the central nervous system of earthworm, *Eisenia fetida*.** Acta Biol Hung. 63 Suppl 1:114-28, 2012.
- CUMURCU, B.E. et al. **Analysis of manganese superoxide dismutase (MnSOD: Ala-9Val) and glutathione peroxidase (GSH-Px: Pro 197 Leu) gene polymorphisms in mood disorders.** Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, v.13, n.2, p.109-113, 2013.
- DOMINGUEZ, L.J. et al. **Ageing, lifestyle modifications, and cardiovascular disease in developing countries.** The Journal of Nutrition Health and Aging, v.10, p.2, p.143-149, 2006.
- DAMJANOVIC, L.; HANLEY, J. R. **Recalling episodic and semantic information about famous faces and voices.** Memory & Cognition, 35, 1205-1210, 2007.
- DANDEKAR A, MENDEZ R, ZHANG K. **Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease.** Methods Mol Biol. 1292:205-14, 2015.
- DE KLOET ER, JOËLS M, HOLSBOER F. **Stress and the brain: from adaptation to disease.** Nat Rev Neurosci. 6(6):463-75, 2005.

- DING Y, DAI J. **Advance in Stress for Depressive Disorder**. Adv Exp Med Biol. 1180:147-178, 2019.
- DOYLE K, WEBER E, ATKINSON JH, GRANT I, WOODS SP. HIV Neurobehavioral Research Program (HNRP) Group. **Aging, prospective memory, and health-related quality of life in HIV infection**. AIDS Behav. 16(8):2309-18, 2012.
- 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. 24(5):5078-5088, 2017.
- 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. 43(13-14):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 fibrinolytics blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism**. Pharmacogenomics J.16(6):501-506, 2016.
- DZIECHCIAŻ M, FILIP R. **Biological psychological and social determinants of old age: bio-psycho-social aspects of human aging**. Ann Agric Environ Med. 21(4):835-8, 2014.
- EINARSON TR, ACS A, LUDWIG C, PANTON UH. **Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017**. Cardiovasc Diabetol. 8;17(1):83, 2018.
- ENDO Y, ENDO T. **Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in the brain neurosecretory cells of invertebrates (insects and earthworms)**. Neurosci Lett. 19;90(1-2):11-4, 1988.
- ENGELMANN P, HAYASHI Y, BODÓ K, ERNSZT D, SOMOGYI I, STEIB A, ORBÁN J, POLLÁK E, NYITRAI M, NÉMETH P, MOLNÁR L. **Phenotypic and functional characterization of earthworm coelomocyte subsets: Linking light scatter-based cell typing and imaging of the sorted populations**. Dev Comp Immunol. 65:41-52, 2016.
- ENGELGAU, M. et al. **The economic effect of noncommunicable diseases on households and nations: a review of existing evidence**. Journal of Health Communication, v.16 p.75-81, 2011.
- ERGAN P, VODIČKA M, SOTÁK M, KLUSOŇOVÁ P, BEHULIAK M, ŘEHÁKOVÁ L, ZACH P, PÁCHA J. **Differential impact of stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis: gene expression changes in Lewis and Fisher rats**. Psychoneuroendocrinology. 53:49-59, 2015.

EPEL ES, LITHGOW GJ. **Stress biology and aging mechanisms: toward understanding the deep connection between adaptation to stress and longevity.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 69 Suppl 1(Suppl 1):S10-6, 2014.

FEDERENKO IS, SCHLOTZ W, KIRSCHBAUM C, BARTELS M, HELLHAMMER DH, WÜST S. **The heritability of perceived stress.** Psychol Med. 36(3):375-85, 2006.

FEDER A, NESTLER EJ, CHARNEY DS. **Psychobiology and molecular genetics of resilience.** Nat Rev Neurosci. (6):446-57, 2009.

FRANCESCHI C, GARAGNANI P, PARINI P, GIULIANI C, SANTORO A. **Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases.** Nat Rev Endocrinol. 14(10):576-590, 2018.

FRIEDMAN AK, JUAREZ B, KU SM, ZHANG H, CALIZO RC, WALSH JJ, CHAUDHURY D, ZHANG S, HAWKINS A, DIETZ DM, MURROUGH JW, RIBADENEIRA M, WONG EH, NEVE RL, HAN MH. **KCNQ channel openers reverse depressive symptoms via an active resilience mechanism.** Nat Commun. 24;7:11671, 2016.

FONKEN LK, FRANK MG, GAUDET AD, MAIER SF. **Stress and aging act through common mechanisms to elicit neuroinflammatory priming.** Brain Behav Immun. 73:133-148, 2018.

FUJIKAKE, N.; SHIN, M.; SHIMIZU, S. **Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases.** Frontiers Neuroscience. v.22, p.212:255, 2018.

FRIES GR, VASCONCELOS-MORENO MP, GUBERT C, SANTOS BTMQD, ROSA ALST, EISELE B. **Early apoptosis in peripheral blood mononuclear cells from patients with bipolar disorder.** J Affect Disord. 152:474–7, 2014.

GAŁECKI P, SMIGIELSKI J, FLORKOWSKI A, BOBIŃSKA K, PIETRAS T, SZEMRAJ J. **Analysis of two polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene (Ile-58Thr and Ala-9Val) in patients with recurrent depressive disorder.** Psychiatry Res. 179(1):43-6, 2010.

GALLETLY C, DHILLON VS, LIU D, BALZAN RP, HAHN LA, FENECH MF. **Shorter telomere length in people with schizophrenia: A preliminary study from Australia.** Schizophr Res. 190: 46-51, 2017.

GARDNER CR. **The neuronal control of locomotion in the earthworm.** Biol Rev Camb Philos Soc. 51(1):25-52, 1976.

GODOY LD, ROSSIGNOLI MT, DELFINO-PEREIRA P, GARCIA-CAIRASCO N, DE LIMA UMEOKA EH. **A Comprehensive Overview on Stress Neurobiology: Basic Concepts and Clinical Implications.** Front Behav Neurosci. 3;12:127, 2018.

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.

- GOUIN JP, KIECOLT-GLASER JK, MALARKEY WB, GLASER R. **The influence of anger expression on wound healing.** Brain Behav Immun. 2008 Jul;22(5):699-708.
- GRAGNOLI C. **Depression and type 2 diabetes: cortisol pathway implication and investigational needs.** J Cell Physiol. 227(6):2318-22, 2012.
- GRAS, H. **The tail flattening reflex in Lumbricus: Reconstitution after tail amputation and modifications in segmental nerve roots.** Journal of Neurobiology, 15(4), 249–261, 1984.
- GREEN C, SHEN X, STEVENSON AJ, CONOLE ELS, HARRIS MA, BARBU MC, HAWKINS EL, ADAMS MJ, HILLARY RF, LAWRIE SM, EVANS KL, WALKER RM, MORRIS SW, PORTEOUS DJ, WARDLAW JM, STEELE JD, WAITER GD, SANDU AL, CAMPBELL A, MARIONI RE, COX SR, CAVANAGH J, MCINTOSH AM, WHALLEY HC. **Structural brain correlates of serum and epigenetic markers of inflammation in major depressive disorder.** Brain Behav Immun. 92:39-48, 2021.
- GHOSH S. **Environmental pollutants, pathogens and immune system in earthworms.** Environ Sci Pollut Res Int. 2018 Mar;25(7):6196-6208.
- GUZIK TJ, KORBUT R, ADAMEK-GUZIK T. **Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.** J Physiol Pharmacol. 2003 Dec;54(4):469-87.
- HACKETT RA, KIVIMÄKI M, KUMARI M, STEPTOE A. **Diurnal cortisol patterns, future diabetes, and impaired glucose metabolism in the whitehall ii cohort study.** J Clin Endocrinol Metab. 101(2):619-25, 2016
- HAMA K. **The fine structure of some blood vessels of the earthworm, Eisenia foetida.** J Biophys Biochem Cytol. 7(4):717-24, 1960.
- HERACLIDES A, CHANDOLA T, WITTE DR, BRUNNER EJ. **Psychosocial stress at work doubles the risk of type 2 diabetes in middle-aged women: evidence from the Whitehall II study.** Diabetes Care. 32(12):2230-5, 2009.
- HOMA J, ORTMANN W, KOLACZKOWSKA E. **Conservative Mechanisms of Extracellular Trap Formation by Annelida Eisenia andrei: Serine Protease Activity Requirement.** PLoS One. 14;11(7):e0159031, 2016.
- IRIZAR A, RODRÍGUEZ MP, IZQUIERDO A, CANCIO I, MARIGÓMEZ I, SOTO M. **Effects of soil organic matter content on cadmium toxicity in Eisenia fetida: implications for the use of biomarkers and standard toxicity tests.** Arch Environ Contam Toxicol. 68(1):181-92, 2015.
- JOBIM ML, AZZOLIN VF, ASSMANN CE, MORSCH VMM, DA CRUZ IBM, DE FREITAS BAUERMAN L. **Superoxide-hydrogen peroxide imbalance differentially modulates the keratinocytes cell line (HaCaT) oxidative metabolism via Keap1-Nrf2 redox signaling pathway.** Mol Biol Rep. 46(6):5785-5793, 2019.
- JOSEPH JJ, GOLDEN SH. **Cortisol dysregulation: the bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus.** Ann N Y Acad Sci. 1391(1):20-34, 2017.

KALINICHENKO LS, KORNHUBER J, MÜLLER CP. **Individual differences in inflammatory and oxidative mechanisms of stress-related mood disorders.** Front Neuroendocrinol. 2019.

KESSLER RC, BIRNBAUM HG, SHAHLY V, BROMET E, HWANG I, MCLAUGHLIN KA, SAMPSON N, ANDRADE LH, DE GIROLAMO G, DEMYTTENAERE K, HARO JM, KARAM AN, KOSTYUCHENKO S, KOVESH V, LARA C, LEVINSON D, MATSCHINGER H, NAKANE Y, BROWNE MO, ORMEL J, POSADA-VILLA J, SAGAR R, STEIN DJ. **Age differences in the prevalence and co-morbidity of DSM-IV major depressive episodes: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative.** Depress Anxiety. 27(4):351-64, 2010.

KHAN MB, CUI X, JILANI G, LAZZAT U, ZEHRA A, HAMID Y, HUSSAIN B, TANG L, YANG X, HE Z. **Eisenia fetida and biochar synergistically alleviate the heavy metals content during valorization of biosolids via enhancing vermicompost quality.** Sci Total Environ.;684:597-609, 2019.

KHANDAKER GM, PEARSON RM, ZAMMIT S, LEWIS G, JONES PB. **Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study.** JAMA Psychiatry.;71(10):1121-8, 2014.

KIELY KM, BRADY B, BYLES J. **Gender, mental health and ageing.** Maturitas. 129:76-84, 2019.

KITAMURA Y, NAGANOMA Y, HORITA H, OGAWA H, OKA K. **Serotonin-induced nitric oxide production in the ventral nerve cord of the earthworm, Eisenia fetida.** Neurosci Res.41(2):129-34, 2001.

KIVIMÄKI M, STEPTOE A. **Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease.** Nat Rev Cardiol. 15(4):215-229, 2018.

KOZA A, CSOKNYA M. **Embryogenesis of GABAergic elements in the nervous system of Eisenia fetida (Annelida, Oligochaeta).** Acta Biol Hung. 55(1-4):323-33, 2004.

KRISHNAN V, HAN MH, GRAHAM DL, BERTON O, RENTHAL W, RUSSO SJ, LAPLANT Q, GRAHAM A, LUTTER M, LAGACE DC, GHOSE S, REISTER R, TANNOUS P, GREEN TA, NEVE RL, CHAKRAVARTY S, KUMAR A, EISCH AJ, SELF DW, LEE FS, TAMMINGA CA, COOPER DC, GERSHENFELD HK, NESTLER EJ. **Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions.** Cell. 19;131(2):391-404, 2007.

KIM, Y. et al.. **Molecular Mechanisms of Bipolar Disorder: Progress Made and Future Challenges.** Frontiers in Cellular Neuroscience, v.14, p.11-30, 2017.

KUMAR, A., CHANANA, P. **Role of Nitric Oxide in Stress-Induced Anxiety: From Pathophysiology to Therapeutic Target.** Vitamin Hormone. v.103, p.147-167, 2017.

KUREK, A; PLYTYCZ, B. **Annual changes in coelomocytes of four earthworm species: The 7th international symposium on earthworm ecology** · Cardiff · Wales · 2002,

- LAPAQUETTE P, GUZZO J, BRETILLON L, BRINGER MA. **Cellular and Molecular Connections between Autophagy and Inflammation**. Mediators Inflamm, 2015.
- LAZARUS RS, FOLKMAN S. **Stress, Appraisal and Coping**. New York: Springer-Verlag, 1984.
- LEMIEUX A, AL'ABSI M. **Stress psychobiology in the context of addiction medicine: from drugs of abuse to behavioral addictions**. Prog Brain Res. 223:43-62, 2016.
- LUCA M, GUZIK T, LUCA A. **Oxidative Stress as a Link between Cerebrocardiovascular and Psychiatric Disorders**. Oxid Med Cell Longev 7;2020:5685317, 2020.
- LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, BULLI G, ARAN L, DELLA-MORTE D, GARGIULO G, TESTA G, CACCIATORE F, BONADUCE D, ABETE P. **Oxidative stress, aging, and diseases**. Clin Interv Aging. 26;13:757-772, 2018.
- LIU, C.P., LEUNG, D.S., CHI, I. **Social functioning, polypharmacy and depression in older Chinese primary care patients**. Aging Ment Health, v.15, n.6, p.732-741, 2011.
- LIU CS, ADIBFAR A, HERRMANN N, GALLAGHER D, LANCTÔT KL. **Evidence for Inflammation-Associated Depression**. Curr Top Behav Neurosci. 31:3-30, 2017.
- LIU H, ZHANG C, JI Y, YANG L. **Biological and Psychological Perspectives of Resilience: Is It Possible to Improve Stress Resistance?** Front Hum Neuroscience. 21;12:326, 2018.
- LOVERA, J.; REZA, T. **Stress in multiple sclerosis: review of new developments and future directions**. Current Neurology and Neuroscience Reports. v.13, n.11, p.398-403, 2013.
- LU, X.T. et al. **The Role of Psychological Stress on Heart Autophagy in Mice With Heart Failure**. Psychosomatic Medicine, v.79, n.9, p.1036-1044, 2017.
- MACHADO, A. et al. **Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease**. Reviews in Neuroscience, v.25, n.6, p.785-804, 2014.
- MACMANUS LE, RONGAUS VA, KLEIN RL. **Meconium ileus with cystic fibrosis**. J Am Osteopath Assoc. 81(9):616-7, 1982.
- MAJD M, SAUNDERS EFH, ENGELAND CG. **Inflammation and the dimensions of depression: A review**. Front Neuroendocrinol. 56:100800, 2020.
- MALHI GS, MANN JJ. **Depression**. Lancet. 24;392(10161):2299-2312, 2018.
- MCEWEN BS. **The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance**. Brain Res.886(1-2):172-189, 2000.
- MCEWEN BS, BOWLES NP, GRAY JD, HILL MN, HUNTER RG, KARATSOREOS IN, NASCA C. **Mechanisms of stress in the brain**. Nat Neurosci. 18(10):1353-63, 2015.

MCEWEN BS, MORRISON JH. **The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course.** *Neuron.* 10;79(1):16-29, 2013.

MCEWEN BS, STELLAR E. **Stress and the individual. Mechanisms leading to disease.** *Arch Intern Med.* 27;153(18):2093-101, 1993.

MCEWEN BS, WINGFIELD JC. **The concept of allostasis in biology and biomedicine.** *Horm Behav.*43(1):2-15, 2003.

MCMANUS FE, WYERS EJ. **Induced variability in the distribution of activity over the circadian cycle.** *J Comp Physiol Psychol.* 96(6):1022-6, 1982.

MCPHEE, J.; GANONG, W. F. **Fisiopatologia da Doença: Uma Introdução à Medicina Clínica.** 5a Edição, McGraw-Hill, RJ, Brasil, 2007.

MENDES, A. C. et al. **The public healthcare system in the context of Brazil's demographic transition: current and future demands.** *Cadernos de Saude Publica,* v.28, n.5, p.955-964, 2012.

MÉNARD C, PFAU ML, HODES GE, RUSSO SJ. **Immune and Neuroendocrine Mechanisms of Stress Vulnerability and Resilience.** *Neuropsychopharmacology.* 42(1):62-80, 2017.

MICHALSKI LJ, DEMERS CH, BARANGER DAA, BARCH DM, HARMS MP, BURGESS GC, BOGDAN R. **Perceived stress is associated with increased rostral middle frontal gyrus cortical thickness: a family-based and discordant-sibling investigation.** *Genes Brain Behav.* 16(8):781-789, 2017.

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.

MITSONIS CI, POTAGAS C, ZERVAS I, SFAGOS K. **The effects of stressful life events on the course of multiple sclerosis: a review.** *Int J Neurosci.* 119(3):315-35, 2009.

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

MOSLEY, R.L. **Adaptive Immunity in Neurodegenerative and Neuropsychological Disorders.** *Journal of NeuroImmune Pharmacology.* v.10, n.4, p.522-527, 2015.

MOLNÁR L, ENGELMANN P, SOMOGYI I, MÁCSIK LL, POLLÁK E. **Cold-stress induced formation of calcium and phosphorous rich chloragocyte granules (chloragosomes) in the earthworm *Eisenia fetida*.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 163(2):199-209, 2012.

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.

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.

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. 60(1):30-3, 2012.

MÜLLER L, DI BENEDETTO S, PAWELEC G. **The Immune System and Its Dysregulation with Aging.** Subcell Biochem. 91:21-43, 2019.

MURPHY, M. A. et al. **A reduction in serum cytokine levels parallels healing of venous ulcers in patients undergoing compression therapy.** European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, v. 23, n. 4, p. 349-352, 2002.

NOVAK M, BJÖRCK L, GIANG KW, HEDEN-STÅHL C, WILHELMSSEN L, ROSENGREN A. **Perceived stress and incidence of Type 2 diabetes: a 35-year follow-up study of middle-aged Swedish men.** Diabet Med. 30(1):e8-16, 2013.

OECD. **Guidelines for Testing of Chemicals: Earthworm Acute Toxicity Test.** No 207. Paris (France). https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-207-earthworm-acute-toxicity-tests_9789264070042-en, 1984.

OECD. **Guidance Document on Good in Vitro Method Practices (GIVIMP).** <http://www.oecd.org/env/guidance-document-on-good-in-vitro-method-practices-givimp9789264304796-en.htm>, 2018.

OSTIGUY CS, ELLENBOGEN MA, LINNEN AM, WALKER EF, HAMMEN C, HODGINS S. **Chronic stress and stressful life events in the offspring of parents with bipolar disorder.** J Affect Disord. 114(1-3):74-84,2009.

OPES, C. S. et al. **Eventos de vida produtores de estresse e transtornos mentais comuns: resultados do Estudo Pró-Saúde.** Cadernos de Saúde Pública, v.19, n.6, 2003.

OUDE VOSHAAR RC, VAN DER VEEN DC, HUNT I, KAPUR N. **Suicide in late-life depression with and without comorbid anxiety disorders.** Int J Geriatr Psychiatry. 31(2):146-52, 2016.

PAE, C.U. et al. **Manganese superoxide dismutase (MnSOD: Ala-9Val) gene polymorphism and mood disorders: a preliminary study.** Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v.30, n.7, p.1326-1329, 2006.

PALLAS, S. L., and DREWES, C. D. **The rapid tail flattening component of MGF-mediated escape behavior in the earthworm, Lumbricus terrestris.** Comp. Biochem. Physiol. 70A: 57- 64, 1981.

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.372(1-2):127-35, 2013.

PAYNE, J.K. **State of the science: stress, inflammation, and cancer.** Oncology Nursing Forum. v.41, n.5, p.533-540, 2014.

PEDERSEN, W.A.; WAN, R.; MATTSON, M.P. **Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems.** Mech Ageing Development, v.122, n.9, p.963-983, 2001.

PEERI M, AMIRI S. **Protective effects of exercise in metabolic disorders are mediated by inhibition of mitochondrial-derived sterile inflammation.** Med Hypotheses.;85(6):707-9, 2015.

PEREIRA, A.; FREITAS, C.; MENDONÇA, C. MARÇALA, F.; SOUZAA, J.; NORONHA, J.P.; LESSA, L.; MELO, L.; GONÇALVES, R.; SHOLL-FRANCO, A. **Envelhecimento, estresse e sociedade: uma visão psiconeuroendocrinológica.** Ciências & Cognição; v.01: 34-53, 2004.

PIERONE BC, PEREIRA CA, GARCEZ ML, KASTER MP. **Stress and signaling pathways regulating autophagy: From behavioral models to psychiatric disorders.** Exp Neurol. 334:113485, 2020.

PIIRAINEN S, YOUSSEF A, SONG C, KALUEFF AV, LANDRETH GE, MALM T, TIAN L. **Psychosocial stress on neuroinflammation and cognitive dysfunctions in Alzheimer's disease: the emerging role for microglia?** Neurosci Biobehav Rev. 77:148-164, 2017.

PONESAKKI V, PAUL S, MANI DKS, RAJENDIRAN V, KANNIAH P, SIVASUBRAMANIAM S. **Annotation of nerve cord transcriptome in earthworm *Eisenia fetida*.** Genom Data. 12;14:91-105, 2017.

PUNDER K, HEIM C, WADHWA PD, ENTRINGER S. **Stress and immunosenescence: The role of telomerase.** Psychoneuroendocrinology.:87-100,2019.

RAVANAN, P.; SRIKUMAR, I.F.; TALWAR, P. **Autophagy: The spotlight for cellular stress responses.** Life Science, v.188, p.53-67, 2017.

RICO A, SABATER C, CASTILLO MÁ. **Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*.** Ecotoxicol Environ Saf.127:222-9, 2016.

RISHWORTH, A.; ELLIOTT, S.J. **Global environmental change in an aging world: The role of space, place and scale.** Social Science & Medicine, 2018.

ROGERS ML, RINGER FB, JOINER TE. **The association between suicidal ideation and lifetime suicide attempts is strongest at low levels of depression.** Psychiatry Res. 270:324-328, 2018.

ROOSE SP, SCHATZBERG AF. **The efficacy of antidepressants in the treatment of late-life depression.** J Clin Psychopharmacol. 25(4 Suppl 1):S1-7, 2005.

- RUIZ SA, OR D. **Biomechanical limits to soil penetration by earthworms: direct measurements of hydroskeletal pressures and peristaltic motions.** J R Soc Interface. 15(144):20180127, 2018.
- RUSHTON WA. **Reflex conduction in the giant fibres of the earthworm.** Proc R Soc Med. 10;133:109-20, 1946.
- SCHULKIN J, MCEWEN BS, GOLD PW. **Allostasis, amygdala, and anticipatory angst.** Neurosci Biobehav Rev. 18(3):385-96, 1994.
- SCHWAN J, SCLAFANI J, TAWFIK VL. **Chronic Pain Management in the Elderly.** Anesthesiol Clin. 37(3):547-560, 2019.
- SELYE H. **The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation.** J Clin Endocrinol Metab. 6:117-230, 1946.
- SELYE, H. **The stress of life.** New York: McGraw Hill, 1984
- SHALEV I, ENTRINGER S, WADHWA PD, WOLKOWITZ OM, PUTERMAN E, LIN J, EPEL ES. **Stress and telomere biology: a lifespan perspective.** Psychoneuroendocrinology. 38(9):1835-42, 2013.
- SHI Y, XU X, CHEN J, LIANG R, ZHENG X, SHI Y, WANG Y. **Antioxidant gene expression and metabolic responses of earthworms (*Eisenia fetida*) after exposure to various concentrations of hexabromocyclododecane.** Environ Pollut. 232:245-251, 2018.
- SHI Z, TANG Z, WANG C. **A brief review and evaluation of earthworm biomarkers in soil pollution assessment.** Environ Sci Pollut Res Int. 2017 May;24(15):13284-13294.
- SIES H. **Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine.** Redox Biol. 4:180-3, 2015.
- SIMPSON MJ, MCKELVIE JR. **Environmental metabolomics: new insights into earthworm ecotoxicity and contaminant bioavailability in soil.** Anal Bioanal Chem. 394(1):137-49, 2009.
- SOLT Z, ZSOMBOK A, POLLÁK E, MOLNÁR L. **NADPH-diaphorase histochemistry selectively stains peripheral and central sensory structures of lumbricid earthworms.** Acta Biol Hung. 67(4):364-372, 2016.
- SOUSA, M. B. C.; SILVA, H. P. A.; GALVAO-COELHO, N. L. **Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase.** Estud. psicol. v..20, n.1, p.2-11, 2015.
- SPORHASE-EICHMANN, U., GRAS, H., SCHURMANN, F. W. **Patterns of serotonin-immunoreactive neurons in the central nervous system of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. I. Ganglia of the ventral nerve cord.** Cell Tissue Res. 249, 604–614, 1987.
- SPÖRHASE-EICHMANN, U., WINKLER, M. & SCHÜRSMANN, FW. **Dopaminergic Sensory Cells in the Epidermis of the Earthworm.** Sci Nat 85, 547–550, 1998.

STEIMER T, DRISCOLL P. **Inter-individual vs line/strain differences in psychogenetically selected Roman High-(RHA) and Low-(RLA) Avoidance rats: neuroendocrine and behavioural aspects.** *Neurosci Biobehav Rev.*, 29(1):99-112., 2005.

STERLING, P., & EYER, J. **Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology.** In S. Fisher & J. Reason (Eds.), *Handbook of life stress, cognition and health* (p. 629–649). John Wiley & Sons, 1988.

STOJANOVICH L. **Stress and autoimmunity.** *Autoimmun Rev.* Mar;9(5), 2010.

STOJANOVICH L, MARISAVLJEVICH D. **Stress as a trigger of autoimmune disease.** *Autoimmun Rev.* 7(3):209-13, 2008.

SUBARAJA M, KULANDAISAMY A, SHANMUGAM NRS, VANISREE AJ. **Homology modeling identified for purported drug targets to the neuroprotective effects of levodopa and asiaticoside-D in degenerated cerebral ganglions of *Lumbricus terrestris*.** *Indian J Pharmacol.* 51(1):31-39, 2019.

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

SYED Z, ALEXANDER D, ALI J, UNRINE J, SHOULTS-WILSON WA. **Chemosensory cues alter earthworm (*Eisenia fetida*) avoidance of lead-contaminated soil.** *Environ Toxicol Chem.* 36(4):999-1004, 2017.

TANNER CM, KAMEL F, ROSS GW, HOPPIN JA, GOLDMAN SM, KORELL M, MARRAS C, BHUDHIKANOK GS, KASTEN M, CHADE AR, COMYNS K, RICHARDS MB, MENG C, PRIESTLEY B, FERNANDEZ HH, CAMBI F, UMBACH DM, BLAIR A, SANDLER DP, LANGSTON JW. **Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease.** *Environ Health Perspect.* 119(6):866-72, 2011.

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.* 60(4):432–438, 2005.

TOVMASYAN AG, RAJIC Z, SPASOJEVIC I, REBOUCAS JS, CHEN X, SALVEMINI D, SHENG H, WARNER DS, BENOVA L, BATINIC-HABERLE I. **Methoxy-derivatization of alkyl chains increases the in vivo efficacy of cationic Mn porphyrins. Synthesis, characterization, SOD-like activity, and SOD-deficient *E. coli* study of meta Mn(III) N-methoxyalkylpyridylporphyrins.** *Dalton Trans.* 28;40(16):4111-21, 2011.

VALEMBOIS P, LASSÈGUES M, ROCH P. **Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells.** *Dev Comp Immunol.* 16(2-3):95-101, 1992.

VALENZUELA M, VARACALLO M. **Anatomy, Shoulder and Upper Limb, Hand Interossei Muscles.** In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.

- VAN KESTEREN RE, SPENCER GE. **The role of neurotransmitters in neurite outgrowth and synapse formation.** Rev Neurosci. 14(3):217-31, 2003.
- VELKI M, EČIMOVIĆ S. **Important Issues in Ecotoxicological Investigations Using Earthworms.** Rev Environ Contam Toxicol. 239:157-184, 2017.
- VERAS, R.P.; OLIVEIRA, M. **Aging in Brazil: the building of a healthcare model.** Ciencia e Saúde Coletiva v.23, n.6, p.1929-1936, 2018.
- VINKERS CH, JOËLS M, MILANESCHI Y, KAHN RS, PENNINX BW, BOKS MP. **Stress exposure across the life span cumulatively increases depression risk and is moderated by neuroticism.** Depress Anxiety. 31(9):737-45, 2014.
- VINING EP, O'GARA B, DREWES CD. **Electrophysiological correlates of rapid escape reflexes in intact earthworms, Eisenia foetida.** II. Effects of food deprivation on the functional development of giant nerve fibers. J Neurobiol.13(4):355-67, 1982.
- VON KOBBE C. **Cellular senescence: a view throughout organismal life.** Cell Mol Life Sci.75(19):3553-3567, 2018.
- WALKER, C. H., HOPKIN, S. P., SIBLY, R. M., PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology,** Taylor and Francis, London, 1996.
- WANG, C.; SUN, Z; ZHENG, D., LIU, X. **Function of mucilaginous secretions in the antibacterial immunity system of Eisenia fetida,** Pedobiologia, v.54, Supplement, 2011.
- 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.
- WANG Q, TIMBERLAKE MA 2ND, PRALL K, DWIVEDI Y. **The recent progress in animal models of depression.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 3;77: 99-109, 2017.
- WEINBERGER AH, GBEDEMAH M, MARTINEZ AM, NASH D, GALEA S, GOODWIN RD. **Trends in depression prevalence in the USA from 2005 to 2015: widening disparities in vulnerable groups.** Psychol Med.48(8):1308-1315, 2018.
- WIGNER, P. et al. **Variation of genes involved in oxidative and nitrosative stresses in depression.** European Psychiatry, v.48, p.38-48, 2018.
- WIGNER P, CZARNY P, SYNOWIEC E, BIJAK M, BIAŁEK K, TALAROWSKA M, GALECKI P, SZEMRAJ J, SLIWINSKI T. **Variation of genes involved in oxidative and nitrosative stresses in depression.** Eur Psychiatry. v.48, p.38-48, 2018.
- WOO, J. **How Can We Achieve Healthy Aging?** International Journal of Environmental Research and Public Health, v.15, 2017.
- WU Q, GE T, EMOND A, FOSTER K, GATT JM, HADFIELD K, MASON-JONES AJ, REID S, THERON L, UNGAR M, WOULDES TA. **Acculturation, resilience, and the mental health of migrant youth: a cross-country comparative study.** Public Health. 162:63-70, 2018.

WU Z, YIN B, SONG X, QIU J, CAO L, ZHAO Q. **Effects of Salinity on Earthworms and the Product During Vermicomposting of Kitchen Wastes.** Int J Environ Res Public Health. 16(23):4737, 2019.

YANG T, QIAO Y, XIANG S, LI W, GAN Y, CHEN Y. **Work stress and the risk of cancer: A meta-analysis of observational studies.** Int J Cancer. 2019

YEGOROV YE, POZNYAK AV, NIKIFOROV NG, SOBENIN IA, OREKHOV AN. **The Link between Chronic Stress and Accelerated Aging.** Biomedicines. 7;8(7):198, 2020.

ZARE-SHAHABADI A, MASLIAH E, JOHNSON GV, REZAEI N. **Autophagy in Alzheimer's disease.** Rev Neurosci. 26(4):385-95, 2015.

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

ZEJNILOVIC J, AKEV N, YILMAZ H, ISBIR T. **Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer.** Cancer Genet Cytogenet. 189(1):1-4, 2009.

ZIRBES, L.; DENEUBOURG, J.L.; BROSTAU, Y.; HAUBRUGE, E. **A New Case of Consensual Decision: Collective Movement in Earthworms.** v.116, p.546-553, 2010.

CAPÍTULO 8

ESTRESSE E DEPRESSÃO NO IDOSO: O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO ASSOCIADO A INFLAMAÇÃO CRÔNICA

Data de aceite: 03/05/2021

Ivo Emilio da Cruz Jung

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria-RS

Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Programa de Pós-Graduação em Gerontologia
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria-RS

Joana Rosa Rodrigues

Universidade Federal de Santa Maria,
Departamento de Morfologia, Laboratório de
Biogenomica
Santa Maria-RS

Wellington Claudino Ferreira

Universidade Federal de Santa Maria,
Departamento de Morfologia, Laboratório de
Biogenomica
Santa Maria-RS

Barbara O. Turra

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria-RS

Euler Esteves Ribeiro

Fundação Universidade Aberta da Terceira
Idade do Amazonas
Manaus-AM

Thamara Graziela Flores

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria-RS

Fernanda Barbisan

Programa de Pós-Graduação em Gerontologia
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria-RS

RESUMO: O envelhecimento populacional é uma realidade em todo o mundo. Entretanto, viver mais não necessariamente significa viver de forma saudável. O aumento da expectativa de vida não foi acompanhado pelo aumento da expectativa de vida saudável principalmente nos países subdesenvolvidos como é o caso do Brasil. Doenças crônicas como as cardiovasculares e enfermidades neurodegenerativas, tem alta prevalência na população idosa. Ainda, veem aumentando também a prevalência dos transtornos psiquiátricos, em especial a depressão maior na população idosa. O envelhecer se constitui em um período de conflitos e mudanças tanto no aspecto fisiológico quanto no social, gerando estresse muitas vezes contínuo. No estresse crônico psico-ambiental ocorre liberação de cortisol, hormônio pró-inflamatório, quando continuamente liberado, que tem profundo impacto na homeostase e saúde corporal. Ou seja, ocorre ruptura da modulação circadiana do cortisol. Na verdade, tanto o estresse causado por agentes físicos quanto os causados por agentes psicológicos envolvem diferentes redes neurais e atividade celular. Uma vez que o estresse crônico psico-ambiental parece ativar estados de inflamação crônica, que por sua vez contribuem para a evolução da depressão maior. Estudos pressupõe que o estresse oxidativo teria um papel de grande

APENDICE B: ARTIGO PUBLICADO COMO PRIMEIRO AUTOR NÃO RELACIONADO A TESE

Received: 20 May 2020 | Revised: 1 December 2020 | Accepted: 4 December 2020
DOI: 10.1111/jfbc.13596



FULL ARTICLE

Journal of
Food Biochemistry WILEY

Avocado oil (*Persea americana*) protects SH-SY5Y cells against cytotoxicity triggered by cortisol by the modulation of BDNF, oxidative stress, and apoptosis molecules

Jéssica Rosso Motta¹ | Ivo Emilio da Cruz Jung² | Verônica Farina Azzolin¹ | Cibele Ferreira Teixeira² | Luiza Elizabete Braun³ | Daniel Augusto De Oliveira Nerys³ | Marco Aurélio Echart Motano⁴ | Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^{2,5} | Ednea Aguiar Maia-Ribeiro⁶ | Ivana Beatrice Mânica da Cruz¹ | Fernanda Barbisan^{1,2}

¹Graduate Program in Gerontology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

²Pharmacology Graduate Program, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

³Biogenomics Laboratory, Department of Morphology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

⁴Graduate Program Sanitary and Animal Production, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Xanxerê, Brazil

⁵Health Sciences Center, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, Brazil

⁶Research Department, Fundação Universidade Aberta da Terceira Idade do Amazonas, Manaus, Brazil

Correspondence

Fernanda Barbisan, Graduate Program in Gerontology, Universidade Federal de Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, Building 51, Room 2032, Santa Maria, Rio Grande do Sul Province 97105-900, Brazil.
Email: fernandabarbis@gmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; CNPq; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel

Abstract

Chronic psycho-environmental stress can induce neurological dysfunction due to an increase in cortisol levels. It is possible that some food supplements could attenuate its negative impact, such as avocado oil (AO), which is rich in fatty acids with beneficial effects on the brain. This hypothesis was tested by an in vitro model using undifferentiated neuroblastoma cells (SH-SY5Y) exposed to hydrocortisone (HC), an active cortisol molecule with and without AO-supplementation. Cortisol can induce oxidative stress, apoptosis events, and a lowering effect on brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurogenic molecule. As AO protective effects on HC-exposed cells could involve these routes, some markers of these routes were compared among neuroblastoma cultures. In the first assay, the range concentrations of HC exposure that trigger cell mortality and range AO-concentrations that could revert the HC effect. AO at all concentrations tested (2–30 µg/ml) did not present a cytotoxic effect on SH-SY5Y cells, whereas HC at 0.3–10 ng/ml had a dose-dependent cytotoxic effect on these cells. From these results, HC at 10 ng/ml and AO at 5 µg/ml were chosen for mechanistic analysis. AO was able to decrease the oxidative molecules; however, both AO- and HC-induced differential and varied gene expression modulation of these enzymes. AO partially reverted the protein and gene expression of apoptotic markers that were higher in HC-exposed cells. AO also increases the BDNF levels, which are lower HC-exposed cultures. The results indicate that AO could be a beneficial supplement in situations where cortisol levels are elevated, including chronic psycho-environmental stress.

Practical applications

Psychological chronic stress that induces high cortisol exposure has been linked to premature aging and decreased healthy life expectancy. Neurobiological models involving cortisol have suggested a neurotoxic effect of this molecule, increasing the risk of psychiatric and other CNTDs. This effect can have a high impact mainly in

Jéssica Rosso Motta and Ivo Emilio da Cruz Jung are the authors contributed equally to the present study

J Food Biochem. 2021;00:e13596.
<https://doi.org/10.1111/jfbc.13596>

wileyonlinelibrary.com/journal/jfbc

© 2021 Wiley Periodicals LLC. | 1 of 13

Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33480081/> >

APENDICE C: ARTIGO PUBLICADO COMO PRIMEIRO AUTOR NÃO RELACIONADO A TESE

Received: 27 February 2016 | Revised: 16 January 2017 | Accepted: 17 April 2017
DOI: 10.1002/ajhb.23016

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

WILEY  American Journal of Human Biology

Association between T102C 5-HT2A receptor gene polymorphism and 5-year mortality risk among Brazilian Amazon riparian elderly population

Tális O. Silva¹ | Ivo Jung² | Alexis Trott³ | Cláudia G. Bica³ |
Jeferson N. Casarin⁴ | Paola C. Fortuna⁴ | Euler E. Ribeiro⁵ |
Fernanda D. de Assis⁶ | Guilherme C. Figueira⁶ | Fernanda Barbisan² |
Maria Fernanda Manica-Cattani¹ | Beatriz S. R. Bonadiman² | Lucien J. Houenou⁷ |
Pedro Antônio S. do Prado-Lima⁸ | Ivana B. M. da Cruz^{1,2,6}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Laboratory of Molecular Aspects Associated with Genetic Diseases, University of Western Santa Catarina, Unocs, Brazil

⁵Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁶Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

⁷Biotechnology Department, Forsyth Technical Community College, 2100 Silas Creek Parkway, Winston-Salem, North Carolina, 27103, USA

⁸BraInS-PUCRS, Brain Institute, RS, Brazil

Correspondence

Dr. Alexis Trott, Ph.D., Rua Sarmento Leite 245, Centro Histórico, UFCSPA, Porto Alegre-RS 90050-170, Brazil.
Email: alexistrott@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), Grant/Award Number: 421/2011; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant/Award Number: 300969/2009-0; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Grant/Award Number: 402325/2013; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Grant/Award Number: 11/2017-5

Abstract

Objective: Serotonin (5-HT) is a pleiotropic molecule that exerts several functions on brain and peripheral tissues via different receptors. The gene for the 5-HT2A receptor shows some variations, including a T102C polymorphism, that have been associated with increased risk of neuropsychiatric and vascular disorders. However, the potential impact of 5-HT2A imbalance caused by genetic variations on the human lifespan has not yet been established.

Methods: We performed a prospective study involving an Amazon riparian elderly free-living population in Maués City, Brazil, with a 5-year follow-up. Out of a cohort of 637 subjects selected in July, 2009, we genotyped 471 individuals, including 209 males (44.4%) and 262 females (55.6%), all averaging 72.3 ± 7.8 years of age (ranging from 60 to 100 years).

Results: The T102C-SNP genotypic frequencies were 14.0% TT, 28.0% CC, and 58.0% CT. From 80 elderly individuals who died during the period investigated, we observed significantly ($P = .005$) higher numbers of TT carriers (27.3%) and CC carriers (21.2%), compared to heterozygous CT carriers (12.5%). Cox-regression analysis showed that association between the T102C-SNP and elderly survival was independent of age, sex, and other health variables.

Conclusions: Our findings strongly suggest that imbalance in 5-HT2A may cause significant disturbances that lead to an increased susceptibility to death for individuals who are over 60 years of age.

ANEXO A- ESCALA GDS

ESCALA DE DEPRESSÃO GERIÁTRICA - GDS

1. Está satisfeito (a) com sua vida? (não =1) (sim = 0)
2. Diminuiu a maior parte de suas atividades e interesses? (sim = 1) (não = 0)
3. Sente que a vida está vazia? (sim=1) (não = 0)
4. Aborrece-se com freqüência? (sim=1) (não = 0)
5. Sente-se de bem com a vida na maior parte do tempo? (não=1) (sim = 0)
6. Teme que algo ruim possa lhe acontecer? (sim=1) (não = 0)
7. Sente-se feliz a maior parte do tempo? (não=1) (sim = 0)
8. Sente-se freqüentemente desamparado (a)? (sim=1) (não = 0)
9. Prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas? (sim=1) (não = 0)
10. Acha que tem mais problemas de memória que a maioria? (sim=1) (não = 0)
11. Acha que é maravilhoso estar vivo agora? (não=1) (sim = 0)
12. Vale a pena viver como vive agora? (não=1) (sim = 0)
13. Sente-se cheio(a) de energia? (não=1) (sim = 0)
14. Acha que sua situação tem solução? (não=1) (sim = 0)
15. Acha que tem muita gente em situação melhor? (sim=1) (não = 0)

Avaliação:

0 = Quando a resposta for diferente do exemplo entre parênteses.

1= Quando a resposta for igual ao exemplo entre parênteses.
--

Total > 5 = suspeita de depressão
