Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Monique Bezerra Oliveira Ormonde do Carmo

A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo associados às alterações imunológicas, inflamatórias e aterotrombóticas na depressão

Rio de Janeiro
2016

Monique Bezerra Oliveira Ormonde do Carmo

A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo associados às alterações imunológicas, inflamatórias e aterotrombóticas na depressão.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C287 Carmo, Monique Bezerra Oliveira Ormonde do.
A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo associados às alterações imunológicas, inflamatórias e aterotrombóticas na depressão / Monique Bezerra Oliveira Ormonde do Carmo – 2016.
111 f.

Orientadora: Cristiane Matsuura.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Depressão mental - Teses. 2. Óxido nítrico – Teses. 3. Transtorno depressivo maior – Teses. 4. Estresse oxidativo – Teses. I. Matsuura, Cristiane. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.89-008.454

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Monique Bezerra Oliveira Ormonde do Carmo

A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo associados às alterações imunológicas, inflamatórias e aterotrombóticas na depressão

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em, 4 de novembro de 2016.

Banca Examinadora:_____

Prof.ª Dra. Cristiane Matsuura (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof.ª Dra. Mariana Siqueira de Medeiros

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____

Prof. Dr. Elie Cheniaux

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

_____

Prof. Dr. Enéas Rangel Teixeira

Universidade Federal Fluminense - UFF

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que acreditaram e me apoiaram nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos.

Aos meus pais Edjane e Ariston, agradeço eternamente, por acreditarem sempre na minha capacidade e pelo amor incondicional, por serem minha fortaleza.

Ao meu amado esposo, Pedro Henrique, por toda sua paciência, apoio, amor e dedicação à nossa família.

Aos meus familiares e amigos que tanto amo, obrigada por estarem ao meu lado e se orgulharem de mim.

Muito especialmente, àqueles que me orientaram com todo seu carinho de perto ou de longe, meus eternos grandes exemplos: Profª. Tatiana M. C. Brunini e Prof. Antonio Cláudio Mendes-Ribeiro (*in memoriam*).

À minha querida orientadora Cristiane Matsuura, grande modelo de competência e pessoa, que esteve ao meu lado nessa trajetória quando mais precisei e se tornou uma grande amiga.

Às professoras muito especiais: Mariana Siqueira de Medeiros, Monique Moss Perszel e Marcela Anjos, obrigada por poder contar sempre com o profissionalismo e a amizade de vocês.

Aos amigos que conquistei nesses anos, que continuarão a fazer parte da minha vida, muito além do laboratório: Claudia Sequeira, Daniel M. M. Lima, Iara Karise, Ive Sab, Marcia D. Ferraz, Marcos Ferraz, Nathalia Brigido e Wanda Vianna.

Em especial a Daniele C. Abrantes que me ensinou muito e dividiu comigo as conquistas e derrotas, e que mesmo distante fisicamente, estará sempre próxima no meu coração, amiga eterna.

A todos os ICs que já passaram pelo laboratório e àqueles que continuam, obrigada pela ajuda prestada, e também aos funcionários da UERJ.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais com os quais pude contar quando precisei.

Àqueles que fizeram parte direta ou indiretamente dessa trajetória, meu muito obrigada.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

RESUMO

CARMO, Monique Bezerra Oliveira Ormonde do. **A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo associados às alterações imunológicas, inflamatórias e aterotrombóticas na depressão.** 2016. 111f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno mental comum, grave e incapacitante, com uma prevalência crescente em todo o mundo. Além do aumento do risco de mortalidade devido ao suicídio, os sintomas depressivos estão também associados a um risco aumentado de morbidade e mortalidade cardiovascular. Adicionalmente, o TDM pode ser considerado um fator de risco independente para doenças cardiovasculares. Um dos mediadores mais importantes nessa relação é o óxido nítrico (NO), molécula sintetizada não apenas pelo endotélio, mas também por elementos figurados do sangue, tais como: neutrófilos, plaquetas e eritrócitos. O NO desempenha um papel fundamental na vasodilatação, geração de espécies reativas de oxigênio, além da ativação, adesão e agregação de plaquetas, e atividade citotóxica do sistema imune. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a via L-arginina-óxido nítrico e marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos e neutrófilos, bem como analisar a ação destes últimos na agregação plaquetária de pacientes com TDM. O influxo de L-arginina, a atividade da NO sintase e os níveis de GMPc foram medidos em neutrófilos e eritrócitos de 14 pacientes (12 M, 2 H) com TDM não tratados e 15 controles (11 M, 4 H) saudáveis (CS). Além disso, foram avaliadas a expressão das enzimas iNOS, eNOS e gp91phox NADPH oxidase, o *burst* oxidativo e os níveis dos aminoácidos em neutrófilos, e os efeitos destes sobre a agregação de plaquetas. Também foram avaliadas a fragilidade osmótica, a carbonilação de proteínas e a atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e catalase em eritrócitos de TDM e controles. Não houve diferença no transporte da L-arginina em ambas as células, mas a atividade de NOS e os níveis de GMPc estavam reduzidos em neutrófilos de TDM em comparação com CS. Por outro lado, eNOS e iNOS foram superexpressas em neutrófilos de TDM. A expressão da NADPH oxidase gp91phox e o *burst* oxidativo não diferiram em neutrófilos entre os grupos. Os pacientes TDM mostraram um aumento da agregação de plaquetas comparados aos CS. Após a incubação com neutrófilos, observou-se uma redução da agregação plaquetária em ambos os grupos. Nenhuma diferença foi observada na fragilidade osmótica, na carbonilação de proteínas e na atividade da enzima catalase, mas a atividade da SOD e da GPx estavam diminuídas em eritrócitos no TDM. Com base nesses resultados, poderia haver um aumento do estresse oxidativo no TDM devido à baixa disponibilidade de NO nos neutrófilos, e as defesas antioxidantes diminuídas nos eritrócitos. Outro dado importante foi que na presença de neutrófilos a agregação plaquetária foi reduzida, sugerindo que o NO produzido por estas células é suficiente para agir nas plaquetas, bem como sobre células adjacentes. Enfim, uma melhor compreensão da baixa biodisponibilidade de NO na função fagocítica de neutrófilos e sua interação com outras células e tecidos ajudaria a esclarecer os mecanismos associados à disfunção do sistema imune e o aumento da morbidade cardiovascular no TDM.

Palavras-chave: Depressão Maior. Neutrófilos. Óxido nítrico. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

CARMO, Monique Bezerra Oliveira Ormonde do. **L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress associated with immunological, inflammatory and atherothrombotic changes in depression.** 2016. 111f. Tese (Doutorado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Major depressive disorder (MDD) is a common, severe and disabling mental disorder, with an increasing prevalence worldwide. In addition to the increased risk of death due to suicide, depressive symptoms are also associated with an increased risk of cardiovascular morbidity and mortality. Additionally, MDD can be considered an independent risk factor for cardiovascular diseases. One of the most important mediators in this relationship is nitric oxide (NO), a molecule synthesized not only by the endothelium but also by figurative blood elements such as neutrophils, platelets and erythrocytes. NO plays a key role in vasodilation, generation of reactive oxygen species, in addition to platelets activation, adhesion and aggregation, and cytotoxic activity of the immune system. Thus, the aim of this study was to investigate the L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative stress markers in erythrocytes and neutrophils, as well as to analyze the action of these in the platelet aggregation of MDD patients. L-arginine influx, NO synthase activity and cGMP levels were measured in neutrophils and erythrocytes from 14 untreated (12 F, 2 M) MDD patients and 15 healthy (11 F, 4 M) controls (HC). In addition, the expression of the enzymes iNOS, eNOS and gp91phox NADPH oxidase, the oxidative burst and the amino acid levels in neutrophils, and their effects on platelet aggregation were evaluated. The osmotic fragility, the proteins carbonylation and the antioxidant activity SOD, GPx and catalase enzymes in MDD and controls erythrocytes were also assessed. There was no difference in L-arginine transport in both cells, but NOS activity and cGMP levels were reduced in MDD compared to HC neutrophils. On the other hand, eNOS and iNOS were overexpressed in MDD neutrophils. NADPH oxidase gp91phox expression and oxidative burst did not differ in neutrophils between groups. MDD patients showed an increase in platelet aggregation compared to HC. After neutrophils incubation, a platelet aggregation reduction was observed in both groups. No difference was observed in osmotic fragility, proteins carbonylation, and catalase enzyme activity, but SOD and GPx activity were decreased in erythrocytes in MDD. Based on these results, there could be an oxidative stress increase in MDD due to the low availability of NO in neutrophils, and the decreased antioxidant defenses in erythrocytes. Another important finding was that the neutrophils presence reduced platelet aggregation, suggesting that NO produced by these cells is sufficient to act on platelets as well as on adjacent cells. Finally, a better understanding of the low NO bioavailability in the phagocytic neutrophil function and its interaction with other cells and tissues would help to clarify the mechanisms associated with immune system dysfunction and increased cardiovascular morbidity in MDD.

Keywords: Major Depression. Neutrophils. Nitric oxide. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese de L-arginina em seres humanos..... 26
Figura 2 – Síntese de óxido nítrico intracelular..... 27
Figura 3 – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e sistema de defesa antioxidante enzimático..... 29
Figura 4 – Elementos figurados do sangue: neutrófilos, eritrócitos e plaquetas..... 30
Figura 5 – Diapedese dos neutrófilos: ativação, rolamento sobre o endotélio, adesão e transmigração pelas células endoteliais..... 32
Figura 6 – Esquema representativo da ativação do complexo NADPH oxidase e suas subunidades..... 34
Figura 7 – Registro de hemólise provocada por diferentes concentrações de NaCl..... 54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Cinética temporal do influxo de L-arginina (1mM) nos neutrófilos..... 48

Gráfico 2 – Exemplo ilustrativo da curva de saturação do sistema de transporte de L-arginina..... 53

Gráfico 3 – Influxo de L-arginina total em neutrófilos de controles e pacientes com TDM..... 61

Gráfico 4 – Influxo de L-arginina via sistema y^+ em neutrófilos de controles e pacientes com TDM..... 61

Gráfico 5 – Influxo de L-arginina via sistema y^+L em neutrófilos de controles e pacientes com TDM..... 62

Gráfico 6 – Produção basal de L[^{3}H]-citrulina em neutrófilos de controles e pacientes com TDM..... 63

Gráfico 7 – Concentração basal de GMPc em neutrófilos de controles e pacientes com TDM..... 63

Gráfico 8 – Expressão da enzima eNOS em neutrófilos de controles e pacientes com TDM..... 64

Gráfico 9 – Expressão da enzima iNOS em neutrófilos de controles e pacientes com TDM..... 65

Gráfico 10 – Expressão da enzima NADPH oxidase gp 91 phox em neutrófilos de controles e pacientes com TDM..... 66

Gráfico 11 – Medida dos *burst* oxidativo por quimioluminescência dependente de lucigenina (A e B)..... 67

Gráfico 12 – Agregação plaquetária induzida por ADP na presença de neutrófilos..... 69

Gráfico 13 – Influxo total de L-arginina (A) e K_m (B) em eritrócitos de controles e pacientes com TDM..... 70

Gráfico 14 – Produção basal de L[^{3}H]-citrulina em eritrócitos de pacientes com TDM e controles..... 71

Gráfico 15 – Concentrações basais de GMPc em eritrócitos de controles e pacientes com TDM..... 72

Gráfico 16 – IC50 da fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes com TDM e controles..... 72
Gráfico 17 – Atividade da SOD em eritrócitos de controles e pacientes com TDM..... 73
Gráfico 18 – Atividade da GPx em eritrócitos de controles e pacientes com TDM..... 74
Gráfico 19 – Atividade da CAT em eritrócitos de controles e pacientes com TDM..... 74
Gráfico 20 – Carbonilação de proteínas em eritrócitos de controles e pacientes com TDM 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Critérios de exclusão apresentados por sujeitos entrevistados.	45
Tabela 2 –	Características demográficas dos controles saudáveis e dos pacientes com TDM.....	58
Tabela 3 –	Dados laboratoriais dos controles saudáveis e dos pacientes com TDM.....	59
Tabela 4 –	Resultados dos testes aplicados no diagnóstico do TDM.....	60
Tabela 5 –	Dosagem de aminoácidos em neutrófilos dos controles saudáveis e pacientes com TDM.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	Dimetil L-arginina assimétrica
ADP	Adenosina difosfato
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
BH_4	Tetrahidrobiopterina
Ca^{2+}	Cálcio
CAT	Catalase
CEP/HUPE	Comitê de ética e pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto
COX	Ciclo-oxigenase
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4 dinitrofenilhidrazina
DO	Densidades óticas
DSM-IV-TR	Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais-IV- texto revisado
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
FvW	Fator von Willebrand
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclica
GPx	Glutationa peroxidase
GPIIb-IIIa	Glicoproteínas IIb/IIIa
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio

HDL	Lipoproteína de alta densidade
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IC50	Média de inibição de concentração 50%
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K_m	Constante de Michaelis
KOH	Hidróxido de potássio
L-[^{3}H]-arginina	L-arginina tritiada
L-[^{3}H]-citrulina	L-citrulina tritiada
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NMMA	N^G-monometil-L-arginina
MetHb	Meta-hemoglobina
MgCl	Cloreto de magnésio
MPO	Mieloperoxidase
MPV	Volume plaquetário médio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO_3^-	Nitrato
NO_2•	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
Nox2	Proteína da família NADPH oxidase não-fagocítica
O_2	Oxigênio
O_2^- •	Ânion superóxido
$^1O_2$	Dioxigênio singleto
OH•	Ânion hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde

$ONOO^-$	Peroxinitrito
OxiHb	Oxihemoglobina
PDE5	Fosfodiestarases nucleotídicas 5
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PCR	Proteína C-reativa
Phox	Proteína da NADPH oxidase fagocítica
PKG	Proteína quinase dependente G
PMA	Acetato miristato de forbol
PMN	Polimorfonuclear
PRP	Plasma rico em plaquetas
QL	Quimioluminescência
RBC	Células sanguíneas vermelhas
SNO-Hb	S-nitroso hemoglobina
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TDM	Transtorno depressivo maior
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TxA_2	Tromboxano A_2
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
$V_{máx}$	Velocidade máxima de fluxo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	20
1.1	**A história da depressão no Ocidente**	20
1.2	**Transtorno depressivo maior**	22
1.2.1	Definição, etiologia e classificação	22
1.2.2	TDM e doenças cardiovasculares	23
1.3	**A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo em elementos figurados do sangue**	25
1.3.1	Neutrófilos	30
1.3.2	Plaquetas	35
1.3.3	Eritrócitos	36
1.4	**A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo em TDM**	38
1.5	**Relação entre inflamação, NO e DCV no TDM**	40
2	**OBJETIVOS**	43
2.1	**Objetivos gerais**	43
2.2	**Objetivos específicos**	43
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	44
3.1	**Tipo de estudo**	44
3.2	**Seleção de sujeitos**	44
3.3	**Testes quantitativos para o TDM**	45
3.4	**Avaliação laboratorial**	46
3.5	**Isolamento e preparo dos neutrófilos**	46
3.5.1	Transporte de L-arginina em neutrófilos	47
3.5.1.1	Cálculo do influxo	47
3.5.2	Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase em neutrófilos	48
3.5.3	Produção de monofosfato de guanosina cíclica em neutrófilos	49
3.5.4	Mensuração da dosagem de proteínas em neutrófilos	49
3.5.5	Extração de proteínas e western blotting em neurófilos	49
3.5.6	“Burst” oxidativo	50
3.5.7	Dosagem de aminoácidos em neutrófilos	51
3.6	**Isolamento e preparo das plaquetas**	51
3.6.1	Agregação de plaquetas e neutrófilos	51
3.7	**Isolamento e preparo dos eritrócitos**	52
3.7.1	Transporte de L-arginina em eritrócitos	52
3.7.2	Mensuração da atividade da óxido nítrico sintase em eritrócitos	53
3.7.3	Produção de monofosfato de guanosina cíclica em eritrócitos	54
3.7.4	Fragilidade osmótica	54
3.7.5	Avaliação do estresse oxidativo em eritrócitos	55
3.7.5.1	Superóxido dismutase	55
3.7.5.2	Glutationa peroxidase	55

3.7.5.3 Catalase 56
3.7.5.4 Carbonilação de proteínas 56
3.8 **Análise estatística** 57
4 **RESULTADOS** 58
4.1 **Características demográficas dos pacientes deprimidos e sujeitos controles saudáveis** 58
4.2 **Dados laboratoriais e clínicos** 58
4.3 **Testes quantitativos para TDM** 60
4.4 **Neutrófilos** 60
4.4.1 Influxo de L-arginina 60
4.4.2 Atividade da enzima óxido nítrico sintase 62
4.4.3 GMPc 63
4.4.4 Western blotting: eNOS, iNOS e NADPH gp 91 phox 64
4.4.5 "Burst" oxidativo 66
4.4.6 Dosagem de aminoácidos 68
4.4.7 Efeitos dos neutrófilos na agregação plaquetária 69
4.5 **Eritrócitos** 69
4.5.1 Influxo de L-arginina 69
4.5.2 Atividade da enzima óxido nítrico sintase 71
4.5.3 GMPc 71
4.5.4 Fragilidade osmótica 72
4.5.5 Estresse oxidativo 73
4.5.5.1 Atividade da SOD 73
4.5.5.2 Atividade da GPx 73
4.5.5.3 Atividade da catalase 74
4.5.5.4 Carbonilação de proteínas 75
5 **DISCUSSÃO** 76
CONCLUSÃO 82
REFERÊNCIAS 83
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido 99
APÊNDICE B – Ficha Clínica 100
ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa HUPE/UERJ 101
ANEXO B – Inventário de Beck para depressão 102
ANEXO C – Escala de Hamilton para depressão 104
ANEXO D – Comentários sobre o artigo e confirmação da submissão da revisão do artigo 107
ANEXO E – Comprovante de submissão do artigo 111

INTRODUÇÃO

A depressão é um problema de saúde pública, com uma prevalência crescente em muitas regiões do Brasil e no mundo [1]. Caracteriza-se por ser uma doença multifatorial, na qual estão envolvidos: os fatores comportamentais, genéticos e fisiológicos, bem como suas interações.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a depressão é uma das mais graves doenças por apresentar, muitas vezes, episódios de longa duração, altas taxas de cronicidade e de recorrência que levam a perdas profissionais, prejuízos físicos e psíquicos [2]. Envolve distúrbios emocionais e cognitivos, alterações das funções autônomas e endócrinas, e possui considerável morbimortalidade por suicídio e por associações com outras doenças [2, 3]. A depressão é tida como um fator de risco cardiovascular independente e para a recorrência de eventos cardíacos em sujeitos com doenças cardiovasculares (DCV) pré-estabelecidas [4, 5].

Apesar de os processos fisiopatológicos que associam a depressão à DCV não serem totalmente conhecidos, a relação entre essas doenças tem sido sugerida através de alterações em mecanismos biológicos fundamentais, tais como: deficiência de monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina), disfunção do sistema nervoso autônomo, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) [6], aumento da ativação plaquetária, disfunção endotelial, secreção de cortisol e de prolactina [7], trombogênese, vasoconstrição e degradação do colágeno, ativação imune sistêmica, elevada concentração de citocinas pró-inflamatórias circulantes e diminuição dos níveis de moléculas anti-inflamatórias [4, 8, 9]. Dessa forma, a depressão se apresenta como um transtorno psiconeuroimunológico que acelera a lesão das células endoteliais vasculares e promove uma série de eventos inflamatórios e o desenvolvimento de aterosclerose [10].

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram deficiência na produção de óxido nítrico (NO) e aumento do estresse oxidativo em plaquetas, que desempenhariam um papel na ligação entre o transtorno depressivo maior (TDM) e as DCV [9, 11]. Outros estudos também apresentaram um aumento do estresse oxidativo com a redução de mecanismos de defesa antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos, associados a diminuição da capacidade

antioxidante plasmática [12]. Além de uma diminuição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) nas plaquetas e dos metabólitos de NO (NOx) plasmáticos, que inibiriam a produção de NO na depressão [10, 13, 14].

O NO é uma molécula fundamental para a manutenção da integridade vascular, sendo reconhecido, cada vez mais, como um regulador central da homeostase uma vez que é sintetizado por todos os tipos de elementos figurados do sangue e células endoteliais. O NO desempenha um papel importante na vasodilatação, inflamação, adesão e agregação plaquetária, e atividade citotóxica do sistema imune [15, 16].

Os elementos figurados do sangue são conhecidos por interagirem na modulação de vários eventos fisiológicos e patológicos e estão envolvidos na gênese e progressão da aterosclerose e das doenças aterotrombóticas [15]. Os neutrófilos, também denominados como polimorfonucleares (PMNs), são os principais tipos de leucócitos presentes no sangue periférico e constituem a primeira linha de defesa do sistema imune inato que atravessa as paredes dos vasos para entrar nos sítios de infecção, devido à sua abundância no sangue, à eficácia de seu recrutamento e às ações antimicrobianas e fagocitárias [17].

O NO é um importante regulador homeostático da aderência dos leucócitos, ao controlar o rolamento desses ao longo das paredes dos vasos sanguíneos mediado pelas L, P e E-selectinas [18], e por inibir a β2-integrina, um receptor transmembrana crucial para a ativação de neutrófilos e a adesão endotelial. A interação de adesão leucócito-plaqueta, que também envolve a expressão da P-selectina na plaqueta ativada para se ligar aos receptores nos leucócitos, é inibida pelo NO [19]. Esta ação do NO pode, portanto, atenuar as potenciais interações prejudiciais dos neutrófilos com a vasculatura e as plaquetas [20]. A liberação de NO por PMNs encontra-se aumentada depois da trombose sugerindo que estas células possuem importante função na regulação da homeostase ao ter um efeito inibitório na ativação e agregação plaquetária. A interação entre leucócitos e plaquetas pode representar ligação entre hemostasia, trombose e resposta inflamatória [19, 21].

Nessa interação entre os elementos figurados do sangue, vale destacar a importância dos eritrócitos, também conhecidos como hemácias ou células sanguíneas vermelhas (RBC), que teriam a fluidez da membrana e a sua deformabilidade alteradas por doadores de NO. Este atravessa a membrana da hemácia e se liga à hemoglobina, formando S-nitroso hemoglobina, o que seria uma

forma de armazenamento de NO. Assim os eritrócitos são considerados uma das principais fontes de NO na circulação [22-24]. O NO sintetizado pelos eritrócitos atua na modulação do fluxo sanguíneo e da função plaquetária, logo, possui um papel na homeostase vascular e de cardioproteção [25].

Além disso, o NO modula a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). O aumento da síntese de EROs provém dos níveis baixos de NO e da ativação da enzima superóxido gerada pela NADPH oxidase, considerada a maior fonte de espécies reativas na vasculatura. Por outro lado, a diminuição na produção das EROs resulta dos níveis elevados de NO [26-28]. O desequilíbrio entre as EROs e as enzimas antioxidantes levaria ao estresse oxidativo que poderia ser causa de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas como a depressão [29].

Estudos também destacaram o aumento da inflamação no TDM acompanhado por uma resposta imune com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) e interferon gama (IFN-γ) [30, 31].

Para compreender os efeitos das alterações biológicas presentes no TDM, sobretudo as inflamatórias, que poderiam desencadear a disfunção na homeostase vascular e doenças graves como as cardiovasculares, o principal objetivo desse estudo está voltado para a análise da via L-arginina- NO-GMPc e do estresse oxidativo em elementos figurados do sangue.

1 **REVISÃO DA LITERATURA**

1.1 **A história da depressão no Ocidente**

A depressão é o distúrbio de humor mais comum que acompanha a humanidade e está estritamente ligada à história do pensamento ocidental [32].

A depressão descrita no século V a.C. por Hipócrates denominada melancolia, já era considerada uma doença essencialmente cerebral e que deveria ser tratada com remédios orais [32]. Na visão hipocrática (Teoria dos humores), que predominava na época, imaginava-se que os estados emocionais dependiam do balanço dos quatro humores: o sanguíneo (sangue), o fleumático (água), o colérico (bílis amarela) e o melancólico (bílis negra). Etimologicamente, a palavra "melancolia" vem do grego – *melankholia, melas* = preto + *kholé* = bílis, logo, o melancólico era aquele que tinha um excesso do elemento frio e seco no organismo, *a bílis negra*. A concepção de saúde era associada à combinação da natureza com o sistema de humores e a doença era o desequilíbrio dessa combinação [33].

No Ocidente, o estudo da melancolia foi inaugurado por Aristóteles. Sua visão filosófica defendia que a melancolia não seria uma doença, mas parte da própria natureza do ser e da inquietação do sujeito. Na Idade Média, a melancolia era vista como a manifestação da hostilidade de Deus, então, os infiéis a sofriam por estarem distantes de tudo o que era sagrado [34].

Entre os séculos XVII e XIX, a era das ciências buscava determinar a composição e a função do cérebro, e elaborar estratégias biológicas e sociais para refrear as mentes que saíam do controle. Nesse período, mais especificamente no século XVIII foi introduzido, no debate sobre a melancolia em contextos médicos, o termo "depressão" – do latim *de* (baixar) e *premere* (pressionar), isto é, *deprimere* que, literalmente significa "pressionar para baixo". Houve uma preocupação em classificar as doenças mentais e relacioná-las com patologias orgânicas do cérebro, dessa forma, o termo depressão passou a ser mais utilizado pelos psicopatologistas no século XIX [35].

O início do século XX começou com Sigmund Freud e Karl Abraham e as ideias psicanalíticas da mente e do eu, na qual há um vazio estrutural do ser humano a partir da relação do sujeito com a perda e com a falta, "perda de objeto que nem o sujeito sabe dizer qual é". Logo, a depressão só pode ser compreendida

através da história de vida contada pelo sujeito que a vivencia. A psicanálise acolhe um sujeito que se interroga sobre o sentido particular de sua existência diante de uma cultura homogeneizadora, que não deixa espaço para a singularidade. Assim, diante do *vazio da existência* e da *falta de sentido,* surge esta “epidemia” de sujeitos que se dizem “deprimidos”. Nessa época, as publicações de Emil Kraepelin impulsionaram o aperfeiçoamento da nosologia e nosografia psiquiátrica, ao propor uma explicação biológica da doença mental, ligada a um déficit neuro-hormonal e que deve ser tratado com medicamentos antidepressivos (psiquiatria biológica) [34, 36].

A partir da década de 50, com o surgimento das primeiras drogas que se mostraram eficazes no tratamento da depressão e a investigação dos seus mecanismos de ação no organismo, originaram-se as hipóteses bioquímicas da depressão (psicofarmacologia). Estas passaram a ser exploradas pela psiquiatria biológica, que pressupõe a participação de alterações nas condições eletroquímicas do sistema nervoso central na depressão. A hipótese bioquímica se reforça com a psiconeuroimunologia, que aponta a existência de uma comunicação bidirecional entre os sistemas imunológico e neuroendócrino, e evidencia que a depressão maior esteja associada a alterações do sistema imunológico [37].

No início do século XXI, a depressão é com algumas exceções, catalogada no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais e de Comportamento (DSM) como um transtorno mental, recebendo abordagens científicas, como a médica, a psicanalítica e a cognitivista [38]. No senso comum, não menos importante, observa-se ainda as visões filosófica, religiosa e poética.

Enfim, a melancolia de outrora deu lugar à depressão, a qual foi classificada em três níveis: leve, moderada e grave, e passou a ser vista predominantemente como uma doença, que implica em diminuição, déficit e paralisia, seja motora, afetiva ou intelectual [2].

1.2 **Transtorno depressivo maior**

1.2.1. Definição, etiologia e classificação

Transtorno de humor com a maior prevalência na população em geral, a depressão acomete na maioria dos casos mulheres e é mais frequente entre adultos jovens, sendo a idade média de seu início 20 a 30 anos. No entanto, o primeiro episódio do transtorno depressivo maior (TDM) pode surgir em qualquer idade, o que se confirma por diversos estudos [39-42].

No que diz respeito a sua etiologia, a depressão é considerada heterogênea, apresentando causa multifatorial. Portanto, deve ser interpretada como uma desordem bio-psico-socio-cultural. Apresenta-se de forma recorrente, apesar de algumas pessoas vivenciarem um único episódio na vida [2, 43]. De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais DSM-IV, o TDM é uma patologia que está caracterizada pela apresentação de um ou mais episódios depressivos maiores, sem história de episódios de mania ou hipomania [38].

Para o diagnóstico de TDM, o indivíduo deve apresentar pelo menos cinco dos sintomas descritos abaixo, durante um período mínimo de duas semanas, quase todos os dias ou na maior parte do dia. Dentre estes sintomas, pelo menos um deve ser o humor depressivo com tristeza intensa, desesperança, desespero, desamparo e vazio ou a perda do interesse e/ou prazer (anedonia) por quase todas as atividades anteriormente consideradas agradáveis, indicado por relato subjetivo ou observação feita por outros.

a) Diminuição ou aumento de apetite, com perda ou ganho de peso corporal significativo sem estar em dieta;
b) Distúrbio do sono: insônia (dificuldade de conciliar o sono, múltiplos despertares ou sensação de sono muito superficial), despertar matinal precoce (geralmente duas horas antes do horário habitual) ou, menos frequentemente, hipersonia (dorme demais e mesmo assim fica com sono a maior parte do tempo);
c) Alterações na atividade psicomotora (retardo ou agitação);
d) Diminuição da disposição, desânimo, fadiga, e perda da energia e/ou libido, diminuição do desempenho sexual (pode até manter atividade

sexual, mas sem a conotação prazerosa habitual) com cansaço fácil, falta de motivação e de vontade, necessidade de maior esforço para fazer as coisas;

e) Capacidade diminuída de pensar, da atenção e/ou concentrar-se ou tomar decisões, raciocínio mais lento e esquecimento;

f) Pensamentos de morte recorrentes (não apenas medo de morrer) e comportamento suicida caracterizado por ideação recorrente sem um plano específico, ou tentativas de suicídio ou plano específico de cometer suicídio.

Os sintomas causam sofrimento considerável, ou prejuízo funcional, nas atividades sociais, ocupacionais e de lazer. Eles não são desencadeados por luto e nem são o resultado da ação direta do uso de substâncias, ou de uma condição clínica, por exemplo, hipotireoidismo. Não se faz diagnóstico também quando um quadro psiquiátrico mais grave ocorre simultaneamente, como esquizofrenia, transtorno bipolar do humor ou transtorno delirante.

Na depressão há uma interpretação distorcida e negativa da realidade, o que se pode chamar de uma ótica depressiva, um tom “cinzento” para si, os outros e seu mundo; sensação de “falta de sentido na vida”, “vazio da existência“ e “a certeza do nada poder fazer”.

A depressão não deve ser confundida com a apatia, que é um sentimento neutro perante os fatos da vida, mas sim um transtorno de grande gravidade, considerado pela OMS um dos dois maiores problemas de saúde pública, podendo mesmo ultrapassar as doenças cardiovasculares em números de casos registrados [2].

1.2.2 TDM e doenças cardiovasculares

Existem várias evidências que sugerem uma forte relação entre o TDM e a doença cardiovascular. Inclusive, tem sido demonstrado que o TDM é um fator de risco independente para DCV. O TDM piora a mortalidade e morbidade de pacientes cardíacos, por exemplo, após infarto agudo do miocárdio (pós-IAM), na angina instável e estável. Por outro lado, como essa relação é bidirecional, doenças cardíacas também podem precipitar o TDM [44, 45]. Estudos mostram que os

pacientes fisicamente saudáveis ao apresentarem a depressão têm um risco de 2 a 4 vezes maior de desenvolver DCV, independente de outros fatores de risco conhecidos. Existe ainda um aumento de 50% nas mortes por DCV entre pacientes deprimidos em comparação com a população em geral [46].

Fatores presentes no TDM, tais como maiores níveis de ansiedade e estresse, comportamentos de saúde inadequados, por exemplo: má dieta, ausência de sono, tabagismo, inatividade física, e não aderência médica, que exacerbam ainda mais os tradicionais fatores de risco cardíaco, como a hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes e obesidade, podem agravar as DCV [47, 48].

Múltiplos mecanismos biológicos pelos quais o TDM pode predispor a DCV, levando a piora do seu prognóstico e/ou ao maior risco de DCV em sujeitos com TDM, têm sido propostos. Estes incluem a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), alterações no funcionamento do sistema nervoso simpático [49], o decréscimo da variabilidade da frequência cardíaca, níveis aumentados de reagentes de fase aguda, tais como proteína C-reactiva (PCR) e hipercortisolemia que pode estar envolvida no dano tecidual [44]. Também são sugeridos como fatores predisponentes da DCV o aumento de agregação plaquetária [50], os níveis séricos elevados de citocinas pró-inflamatórias e a diminuição dos níveis de moléculas anti-inflamatórias, a hipercoagulabilidade, e a disfunção endotelial, agravantes para desenvolvimento da aterosclerose [51-53].

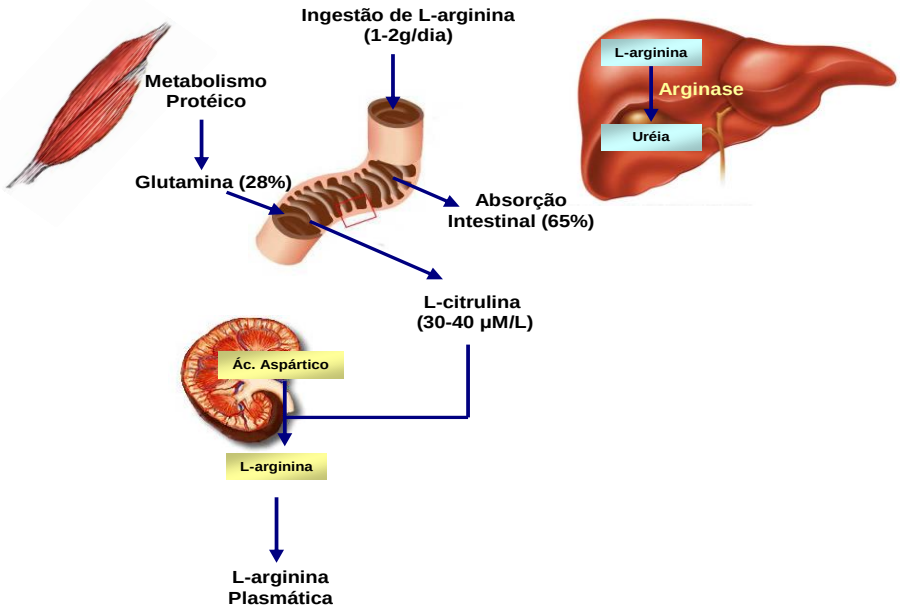
Os fatores de risco cardiovasculares no TDM estão associados com a redução da biodisponibilidade do NO e consequente lesão das células endoteliais. Essa disfunção do endotélio vascular promove doença vascular e aterosclerose através da vasoconstrição com a adesão de alguns elementos figurados do sangue que diminuem a sua velocidade de circulação e contribuem para o enrijecimento das paredes do vaso sanguíneo, da ativação e agregação plaquetária, da inflamação vascular, da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), da proliferação de células do músculo liso, da quebra de colágeno e da trombogênese [54, 55]. Mecanismos nos quais o NO, derivado das células endoteliais e dos elementos figurados do sangue, desempenha um papel fundamental por meio de sua ação inibitória [56, 57].

1.3 **A via L-arginina-NO e o estresse oxidativo (EO) em elementos figurados do sangue**

O NO é um gás inorgânico, com uma meia-vida curta, produzido endogenamente por diferentes tipos de elementos figurados do sangue (neutrófilos, plaquetas, eritrócitos), que possui importante função na mediação dos processos fisiológicos, incluindo neurotransmissão, vasodilatação, atividade citotóxica do sistema imune, regulação do funcionamento do tecido mineralizado e da interação entre endotélio e células sanguíneas, adesão de leucócitos (neutrófilos) e plaquetas à parede do vaso e agregação plaquetária [58].

A síntese de NO ocorre a partir do aminoácido catiônico L-arginina, semi-essencial para a maioria dos mamíferos [59, 60]. As fontes de L-arginina são endógenas e exógenas. Embora seja gerada pelos macrófagos e células endoteliais, a maioria da L-arginina endógena é sintetizada no fígado e no rim pela transferência de um grupo amino a partir de L-aspártico ou ácido L-glutâmico a L-citrulina [61]. Como o fígado utiliza a maior parte de L-arginina produzida no ciclo da ureia, o rim, em conjunto com a ingestão dietética (1-2 g / dia), é responsável pela manutenção de níveis de plasma normal de L-arginina (80-100 μM) [60] (Figura 1).

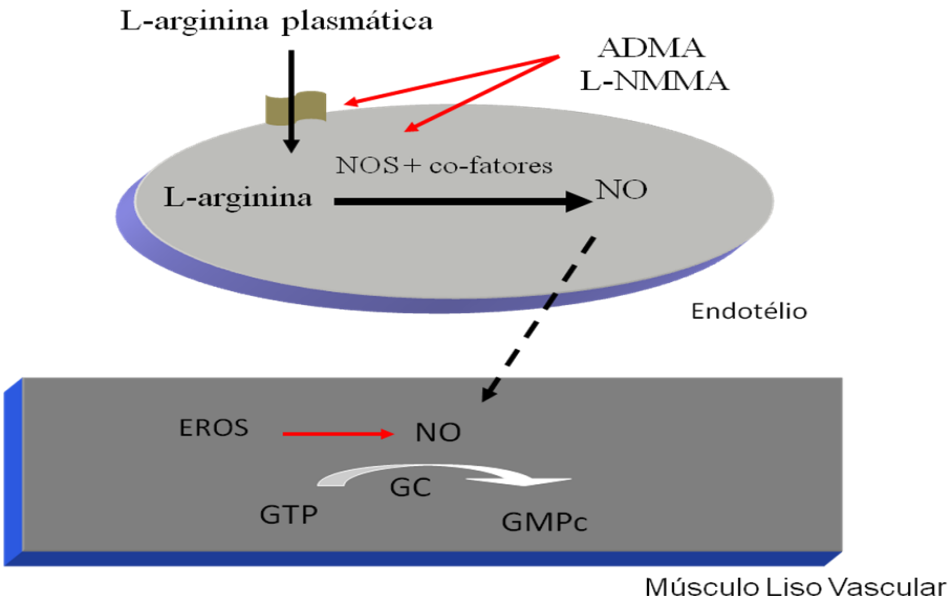
Figura 1 - A síntese de L-arginina em seres humanos.



Fonte: adaptado de REYES *et al.* 1994 [62].

Na maioria das células, a produção do NO é obtida através de uma reação catalisada por 3 isoformas da família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS): neuronal (nNOS ou NOS I), induzível (iNOS ou NOS II) e endotelial (eNOS ou NOS III) [63]. Estas são diferenciadas de acordo com sua localização, dependência do aumento de Ca^{2+} citosólico para a sua atividade, duração da ação e expressão constitutiva ou induzida por estímulo imunológico ou exposição a citocinas inflamatórias [58, 61, 63]. A NOS transforma L-arginina em L-citrulina e NO em quantidades equimolares, utilizando oxigênio molecular e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como co-substrato. A tetrahidrobiopterina (BH_4) é também um cofator chave para as enzimas NOS, já que na sua ausência a NOS produz superóxido ao invés de NO [61, 64, 65] (Figura 2).

Figura 2. Esquema ilustrativo da síntese de NO intracelular.



Legenda: ADMA, L-arginina dimetil assimétrica; EROS, espécies reativas de oxigênio; GC, guanilato ciclase; GMPc, monofosfato de guanosina cíclica; GTP, guanosina trifosfato; L-NMMA, N^G-monometil-L-arginina; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico.
Fonte: A AUTORA, 2016.

Para que a síntese de NO ocorra é necessário que haja inicialmente o que se denomina “paradoxo da L-arginina”, no qual a entrada de L-arginina extracelular é essencial para essa produção, independente dos níveis intracelulares (normais = 0,1-2 mM) suficientes e / ou bem acima do K_m (1-32 µM). Para que esse aminoácido seja transportado, é importante a presença dos carreadores de aminoácidos catiônicos (L-arginina, L-lisina e L-ornitina) y^+, y^+L, $b^{o,+}$ $B^{o,+}$ [15, 59, 66].

Por outro lado, a biodisponibilidade do NO pode ser afetada quando a L-arginina é desviada para outras vias metabólicas, tais como a síntese de agmatina, creatinina, ornitina e ureia [67, 68]. Esta última, conhecida como ciclo da ureia (principalmente no fígado, onde a enzima arginase mostra alta atividade) converte L-arginina em ureia e L-ornitina através da enzima arginase [68, 69]. Nosso estudo anterior ao demonstrar um aumento na atividade da arginase em plaquetas de pacientes TDM, reforça que haja um desvio do substrato L-arginina para esta via [11].

Na via L-arginina-NO, o NO produzido pela NOS ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) e exerce os seus efeitos sobre a maioria dos tecidos e das células por meio da formação de nucleotídeo monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) [63].

GMPc é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa e consequente aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos, levando ao aumento do fluxo sanguíneo e a redução da pressão arterial, além de poder ser o mediador central dos efeitos NO/GMPc em várias regiões do cérebro [70].

O GMPc é degradado pelas fosfodiesterases nucleotídicas (PDEs), que constituem uma família de enzimas reguladores essenciais de sinalização intracelular de nucleotídeos cíclicos, que têm um papel central na transdução de sinal neuronal que poderiam gerar uma suscetibilidade ao TDM [69]. A literatura ainda sugere que o aumento de estresse oxidativo associado a certas patologias, como o TDM, pode levar à resistência das GCs ao NO [51, 71].

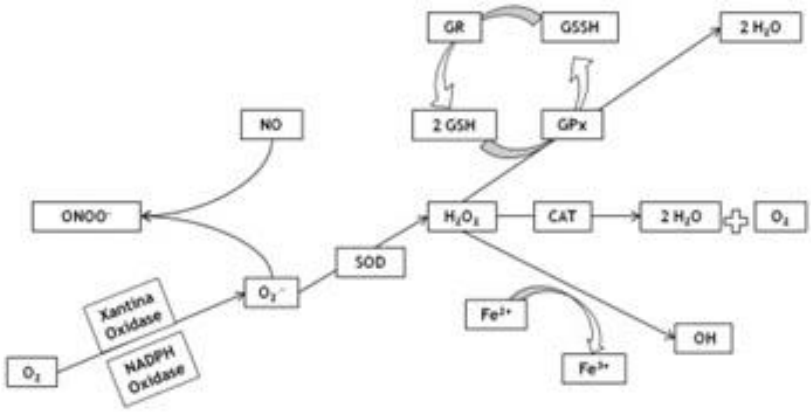
O estresse oxidativo, proveniente de um desequilíbrio entre os compostos oxidantes e os sistemas de defesa antioxidantes, que pode levar a danos oxidativos, reduz a biodisponibilidade do NO, prejudica suas funções vasodilatadoras e anti-inflamatórias, desempenha papel na fisiopatologia de vários distúrbios, incluindo doenças mentais e doenças vasculares ateroscleróticas [72-74].

Os sistemas de defesa antioxidantes são constituídos por sistemas enzimáticos e não enzimáticos que agem de forma sincronizada para protegerem as células de danos causados pela superprodução dos radicais livres. A superóxido-dismutase (SOD), a glutationa peroxidase (GPx), a glutationa redutase (GR) e a catalase (CAT) estão entre as principais enzimas antioxidantes. A bilirrubina, a albumina, o ácido úrico, a glutationa, a vitamina E, a vitamina C e a vitamina A estão entre os principais antioxidantes não enzimáticos [75, 76].

Os radicais livres são espécies químicas muito reativas capazes de existir de forma independente e que contêm um ou mais elétrons desemparelhados. São gerados em muitos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo. Eles participam da atividade bactericida, de processos de sinalização celular e estão envolvidos na síntese e na regulação de algumas proteínas, em condições fisiológicas [76, 77]. Por serem muito reativos reagem com biomoléculas, como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outras estruturas celulares, como membrana, causando dano oxidativo, consequentemente, perturbando o metabolismo normal e podendo causar, até mesmo, a morte celular [77].

Dentre os radicais livres gerados em muitos processos fisiológicos, podemos destacar dois grupos: as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) [76, 78] (Figura 3).

Figura 3. EROs e ERNs, e sistema de defesa antioxidante enzimático.

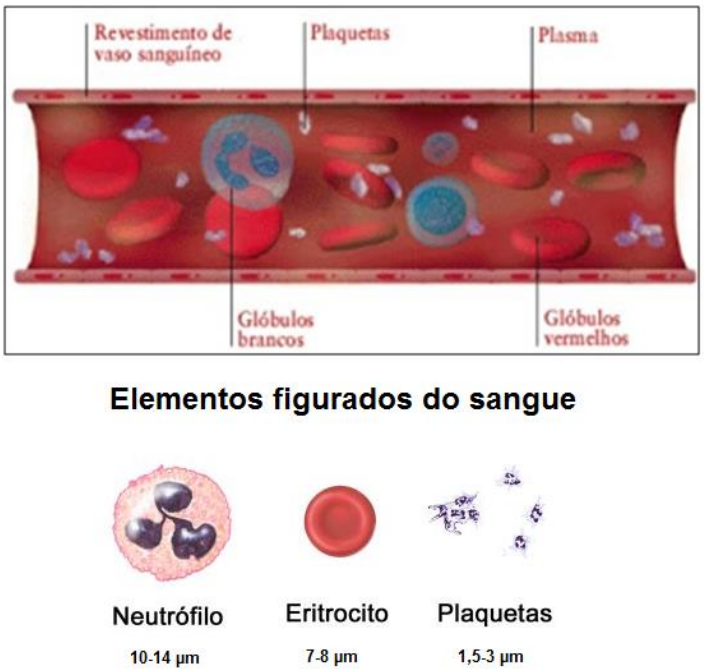


Legenda: H_2O_2, peróxido de hidrogênio. $O_2^{\bullet-}$, ânion superóxido. OH•, radical hidroxila. CAT, catalase. GPx glutationa peroxidase. GR, glutationa redutase. GSH, glutationa reduzida. GSSH, Glutationa oxidada. NO, óxido nítrico. $ONOO^-$, peróxinitrito. SOD, superóxido dismutase. O_2, oxigênio.
Fonte: A AUTORA, 2016.

As EROs mais importantes são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH•), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e o dioxigênio singleto ($^1O_2$) . O $O_2^{\bullet-}$ é o primeiro radical livre formado pela redução do oxigênio (O_2) à água. Sua formação se dá na cadeia respiratória mitocondrial, a partir dos 5% do O_2 utilizados que não são completamente reduzidos à água. Esta ERO muito reativa é removida rapidamente pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), formando H_2O_2, que forma o OH•, porém não há enzima que o remova. Por isso, as enzimas que decompõem o H_2O_2, como a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx), são de extrema importância para os seres vivos [77].

O NO constitui uma das principais ERNs [76, 78] sendo considerado especialmente nocivo em condições patológicas, ao reagir com o $O_2^{\bullet-}$ e gerar peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante. Dessa forma, ocorre o mecanismo de ação citotóxica, um efeito pró-inflamatório do NO nas células. O peroxinitrito pode protonar-se na presença de íons H^+, formando ONOOH, que sofre degradação e resulta no radical NO_2• e OH•. Este é um radical altamente tóxico que reage indiscriminadamente com qualquer componente celular [79]. Mas, em condições fisiológicas, o NO pode ter um efeito anti-inflamatório ao inibir a adesão dos elementos figurados do sangue (neutrófilos, plaquetas e eritrócitos) ao endotélio [80] (Figura 4).

Figura 4. Elementos figurados do sangue: neutrófilos, eritrócitos e plaquetas.



Fonte: A AUTORA, 2016.

1.3.1 Neutrófilos

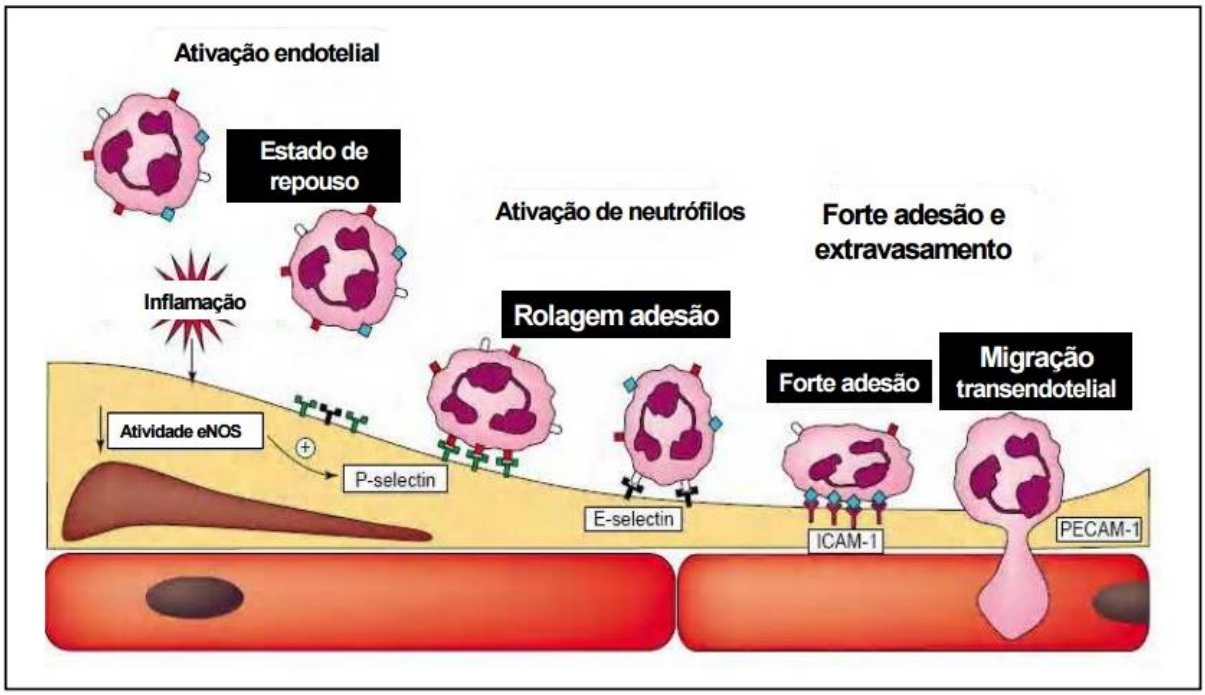
Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) originam-se de células primordiais pluripotentes da medula óssea, que também dão origem aos outros elementos figurados do sangue: plaquetas e eritrócitos. Os PMNs são células que apresentam núcleo poliglobulado (geralmente com três lóbulos ligados por um fino filamento nuclear) e grânulos específicos em seu citoplasma, por isso, são denominados granulócitos. Os neutrófilos compreendem a maior parte destes, e se difere em relação aos demais (eosinófilos e basófilos) pelos seus grânulos de difícil coloração [81].

Após sua formação, cerca de 90% da população de neutrófilos mantém-se na medula óssea, já o restante encontra-se distribuído na circulação e no endotélio vascular. Possuem uma meia-vida curta, em torno de 8h na circulação e pouco mais de 4 dias nos tecidos. Em condições normais, constituem em torno de 50 a 70% dos

leucócitos totais circulantes, glóbulos brancos, que compreendem também os monócitos e os linfócitos [82]. Um adulto saudável possui entre 3000 e 7500 neutrófilos por µL de sangue; porém, em uma infecção, este número pode chegar de 10000 a 25000 [17]. A alta contagem leucocitária é um conhecido fator de risco de doenças vasculares nas populações adulta e jovem, o que pode aumentar fatores pró-inflamatórios do processo aterosclerótico [83, 84].

Os neutrófilos desempenham um papel fundamental como células de primeira linha de defesa a serem ativadas na resposta imune inata à lesão ou à infecção [85]. Os neutrófilos circulantes, quando ativados por um processo infeccioso ou inflamatório, migram dos vasos sanguíneos para o tecido atingido, e liberam componentes tóxicos, como as EROs e as enzimas proteolíticas. Eles chegam ao sítio inflamatório devido a um gradiente de quimiocinas secretadas por macrófagos após a fagocitose de micro-organismos [86]. Esse recrutamento para o local da inflamação envolve a ação de mediadores inflamatórios, principalmente da interleucina-8 (IL-8) [87]. Para chegar ao local de injúria tecidual, há uma interação neutrófilo-endotélio, na junção das células endoteliais, através de um processo denominado diapedese do neutrófilo. Isto compreende uma sequência de eventos: ativação, rolamento sobre o endotélio, adesão e transmigração pelas células endoteliais. Este processo é coordenado por moléculas de adesão, glicoproteínas denominadas selectinas e integrinas, expressas na superfície dos granulócitos e das células endoteliais [88] (Figura 5).

Figura 5. Diapedese dos neutrófilos: ativação, rolamento sobre o endotélio, adesão e transmigração pelas células endoteliais.



Legenda: ICAM-1, molécula de adesão intracelular. PECAM-1, molécula de adesão celular endotelial plaquetária.
Fonte: KAKKAR, A.K., LEFFER, D.J. 2004 [89].

Como mediador da resposta inflamatória, o NO age alterando o tônus e a permeabilidade vascular além de ser agente quimiotático, que afeta a regulação imune e exerce um efeito pró-inflamatório estimulando o aumento da secreção de citocinas, incluindo TNF-α e IL-8 em neutrófilos. Atua na modulação da expressão de P-selectina (proteína de adesão) produzida no endotélio, para reduzir a adesão de leucócitos à parede vascular na inflamação e promove a diminuição da agregação de neutrófilos e de sua secreção [90].

Estudos demonstraram que os neutrófilos geram NO a uma taxa de 10-100 nmols/5min/10^6 células, quantia comparável àquela produzida pelas células do endotélio. Portanto, os neutrófilos contribuem para a quantidade de NO circulante [17]. A capacidade dos neutrófilos de sintetizar NO foi descoberta pela primeira vez através da sua capacidade de relaxar anéis aórticos [91]. A síntese de NO em neutrófilos se dá inicialmente pelo transporte de L-arginina mediado pelos sistemas y^+ e y^+L, seguido pela conversão deste aminoácido em L-citrulina em quantidades equimolares de NO através da atividade da enzima NOS [92]. Os neutrófilos

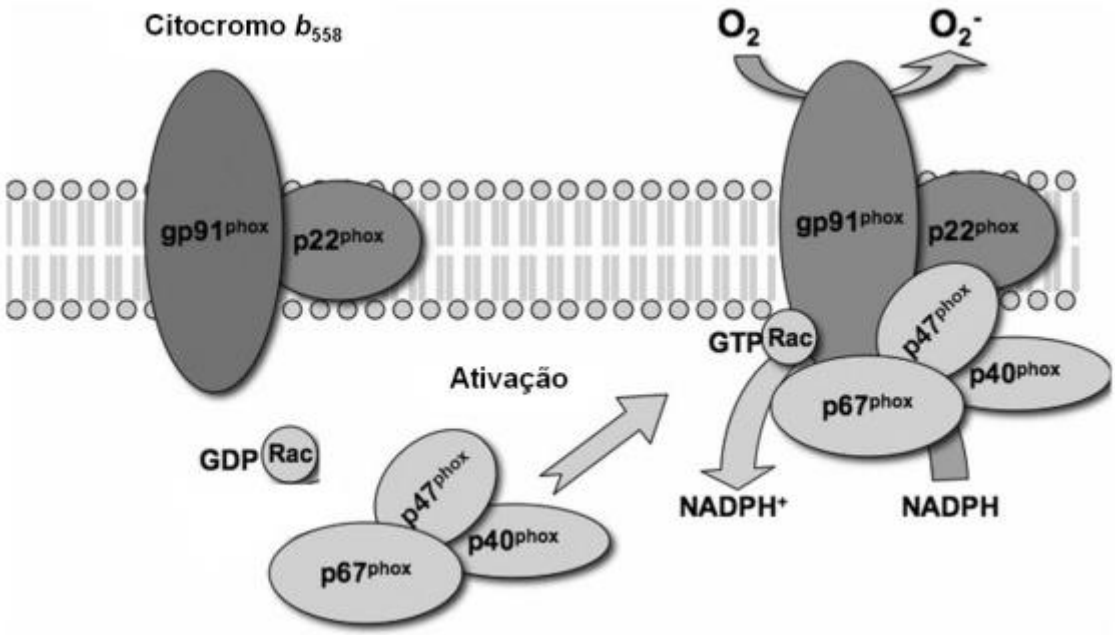
expressam as três isoformas dessa enzima, iNOS, eNOS e nNOs, porém a mais estudada é a iNOS, que aumenta consistentemente a sua quantidade com a maturação da célula [93].

Além do envolvimento na função imune antimicrobiana [94] e da função antitrombótica pela inibição da adesão e agregação plaquetária [95, 96], os neutrófilos estão envolvidos na formação da placa aterosclerótica [97]. Uma série de alterações metabólicas ocorre quando os neutrófilos são ativados por processos inflamatórios e infecciosos. Ao longo dos anos, foram identificadas várias funções como a modulação de cascatas de sinalizações, quimiotaxia, fagocitose de micro-organismos, apoptose e *"burst"* oxidativo (explosão respiratória) [17, 97].

Durante o "*burst*" oxidativo, ocorre o aumento do consumo de O_2 e produção das EROs suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante local. As EROs são produzidas em grande quantidade por um complexo enzimático de membrana ativado, denominado NADPH oxidase, e/ou pelas enzimas peroxidases, como a mieloperoxidase (MPO), que catalisam a redução monovalente do O_2 ao $O_2^{\bullet-}$ [86]. O complexo NADPH oxidase é composto por várias subunidades de proteínas. Em seu estado não ativado duas subunidades permanecem associadas à membrana da célula (proteína da família NADPH oxidase não-fagocítica, Nox2 - gp91phox e p22phox) e as demais no citoplasma (p47phox, p67phox, p40phox e Rac1) [97, 98] (Figura 6). Essas subunidades se unem e o complexo se ativa, quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados [98, 99].

Depois, por dismutação espontânea ou por ação catalítica do $O_2^{\bullet-}$ via SOD, o H_2O_2 é gerado. Em altas concentrações, o H_2O_2 possui atividade bactericida e, para a sua remoção da célula com intuito de evitar sua toxicidade, é convertido em água e O_2 principalmente por ação das enzimas antioxidantes CAT e GPx [100]. As EROs, quando produzidas em excesso, têm sido relacionadas com o aparecimento de processos degenerativos inflamatórios crônicos e aterosclerose, caracterizada por um processo inflamatório na parede vascular [101, 102].

Figura 6. Esquema representativo da ativação do complexo NADPH oxidase em neutrófilos e suas subunidades.



Legenda: Proteína da família NADPH Oxidase não-fagocítica, Nox 2 (gp91 phox) e p22 phox, p67 phox, p47 phox e p40 phox. Em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão espacialmente segregados entre citosol e membrana.
Fonte: DWORAKOWSKI R *et al*. 2006 [103].

Atualmente, há evidências crescentes sugerindo que as plaquetas podem funcionar como células inflamatórias. Estudos demonstraram que os neutrófilos e as plaquetas têm a capacidade de interagir nos locais de lesões dos vasos, hemorragia e trombose [104-106]. Logo, o desenvolvimento da placa aterosclerótica seria exacerbado pela intensidade aumentada dessas interações, que se dá, não só pelas plaquetas ativadas, mas também pelo recrutamento e ativação de neutrófilos com consequente liberação de EROs [107]. Nessa interação, há uma adesão suficientemente forte dos neutrófilos às plaquetas imobilizadas no tecido trombótico ou inflamado, para permitir a formação dos agregados neutrófilos-plaquetas que podem causar obstrução vascular na circulação [108, 109]. Esse processo de interação é dependente das selectinas e integrinas expressas pelas células endoteliais e que promovem ligações firmes das células adjacentes, como os neutrófilos, com o endotélio [110].

Outra hipótese descrita na literatura da interação plaqueta-neutrófilo é de que o NO derivado dos neutrófilos possa inibir diretamente a ativação plaquetária por aumentar a quantidade de GMPc intraplaquetário [111]. Este mensageiro secundário

do NO quando em concentrações elevadas, também aumentaria a produção de TNF-α em neutrófilos [112].

1.3.2 Plaquetas

Fragmentos celulares anucleados derivados dos megacariócitos localizados na medula óssea, as plaquetas medem de 1,5 - 3,0 µm de diâmetro e possuem uma meia-vida de 7 dias na circulação sanguínea. Quando não estimuladas as plaquetas possuem formato de disco achatado e quando ativadas mudam a sua conformação e aglutinam-se podendo atuar na coagulação [113].

Um indivíduo saudável tem entre 150 e 400 mil plaquetas por mm^3 de sangue. Mesmo com a quantidade de células dentro da normalidade, poderá haver problemas de coagulação, caso as plaquetas sejam disfuncionais. A formação de coágulos fica prejudicada devido a deficiências no fator de von Willebrand (FvW) e nas glicoproteínas de membranas (GPIIb–IIIa), que se ligariam a este fator e/ou ao fibrinogênio e, assim, impedem as plaquetas de aderirem ao endotélio [113].

Para que haja a formação do tampão plaquetário, é necessária a ocorrência de três fases distintas nas plaquetas: a adesão, quando a parede do vaso sanguíneo é lesada; a ativação por exposição ao colágeno com a formação de pseudópodes; e a agregação a outras células para formar grandes tampões hemostáticos. A ativação das plaquetas pode ocorrer a partir da ação de diversos agonistas, tais como: a adenosina difosfato (ADP), o colágeno, a trombina, o tromboxano A_2 (TxA_2), a 5-hidroxitriptamina (serotonina), a epinefrina, a vasopressina e o fibrinogênio [114].

A liberação de ADP pelos grânulos densos no meio extracelular possui um efeito catalítico na própria plaqueta que a liberou, além de estimular as plaquetas ao redor. Na medida em que as plaquetas ativadas interagem umas com as outras, elas começam a agregar. A agregação é iniciada pela ativação conformacional do receptor de membrana glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb-IIIa), que garante uma alta afinidade por seus ligantes, e a exposição do local de ligação ao fibrinogênio. A mudança da sua forma ocorre com pequenos aumentos no cálcio (Ca^{2+}) intraplaquetário induzido pela ADP, enquanto a agregação e a secreção de grânulos ocorrem em niveis maiores de Ca^{2+} [115].

O NO secretado pelas células endoteliais e pelas próprias plaquetas é, fisiologicamente, um inibidor natural dessas três fases, sendo um modulador chave, que de forma marcante inibe o recrutamento de plaquetas na formação do trombo [116, 117].

Nas plaquetas, para que ocorra a produção do NO é essencial o transporte de L-arginina mediado via sistema y^+L e não pelo clássico sistema de transporte y^+ de aminoácidos catiônicos. Porém, seu influxo é limitante, independente das concentrações intracelulares deste aminoácido [118]. Além disso, a produção de NO em plaquetas humanas, assim como nos demais elementos figurados do sangue, pode ser afetada pela inibição desse influxo por análogos da L-arginina, tais como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) e Dimetil-L-arginina-assimétrica (ADMA) [119].

As plaquetas expressam tanto as isoformas induzível quanto constitutivas da NOS [120]. O NO gerado por essas enzimas causa uma ativação da GCs, com aumento da produção de GMPc e uma consequente ativação da proteína quinase G (PKG) dependente de GMPc. Esta inibe o influxo de Ca^{2+} para o retículo endoplasmático da plaqueta. Porém, o GMPc pode ser degradado pela fosfodiesterase 5 (PDE5), o que afeta a ação anti-agregante do NO [121].

A biodisponibilidade do NO nas plaquetas também será diminuída pelo EO, a partir do aumento da produção fisiológica das EROs durante a sua ativação, como mostrado no nosso estudo anterior [11]. De forma semelhante ao endotélio, as EROs produzidas pelas plaquetas são geradas por diferentes fontes enzimáticas – NADPH oxidase, NOS e ciclo-oxigenase (COX). O uso de inibidores da NADPH oxidase é capaz de inibir a agregação plaquetária também [122].

Portanto, ao se analisar os fatores envolvidos nas anormalidades funcionais das plaquetas somadas a uma inflamação sistêmica, verifica-se que o aumento da reatividade plaquetária é central para a fisiopatologia da aterosclerose, trombose e eventos coronarianos agudos [123]. Por outro lado, o grande número de eritrócitos no sangue normal ao evitar colisões frequentes das plaquetas, auxilia na manutenção da hemostasia [124]**.**

1.3.3 Eritrócitos

Os eritrócitos, também conhecidos como hemácias ou células sanguíneas vermelhas (RBCs), são células bicôncavas anucleadas produzidas na medula óssea.

Constituem os elementos figurados mais abundantes no sangue, em número de cerca de 4,5 a 6,0 x 10^6/mm³, em condições normais [125].

Responsáveis pelo transporte de oxigênio e dióxido de carbono entre os tecidos corporais e os pulmões, os eritrócitos garantem o suprimento metabólico e os nutrientes no sangue. Além de possuírem a função eritrócrina, com a habilidade de secretarem moléculas vasoativas e cardioprotetoras pela qual contribuem ativamente para a homeostasia vascular e a cardioproteção [126].

Os eritrócitos são carreadores de NO que não apenas o armazena como também o sintetiza e o transporta, apesar de haver certo grau de controversa sobre suas verdadeiras funções [127].

A síntese de NO em eritrócitos é obtida a partir da entrada de L-arginina mediada por dois sistemas de transporte: o sistema y^+ e o sistema y^+L. A conversão de L-arginina a NO e L-citrulina é realizada pela enzima NOS. A regulação da síntese de NO em eritrócitos parece ser diferente daquela em outros tipos celulares, devido à ausência de determinadas organelas e de maquinaria de produção de proteínas. A dependência da disponibilidade de L-arginina, para a produção de NO confere ao ciclo da ureia um lugar de fundamental importância como outra via para a qual esse aminoácido pode ser desviado. Os eritrócitos também expressam a enzima arginase I, a qual hidrolisa a conversão de L-arginina em ornitina e ureia [128-130].

Com a produção de NO nos eritrócitos é possível que estes inibam a função plaquetária, além de promover alterações das características funcionais da membrana plasmática, da sua fluidez, bem como sua deformabilidade. Esta definida como a capacidade de um eritrócito alterar a sua configuração geométrica para minimizar a resistência ao fluxo. Logo, uma diminuição na deformabilidade dos eritrócitos torna-os menos capazes de passarem através dos capilares, podendo aumentar a sensibilidade, para junto das plaquetas participarem da formação de trombos [131, 132].

Outro fator importante a se considerar na alteração da hemorreologia é o aumento no resultado do hematócrito e o consequente aumento na viscosidade pela agregação de eritrócitos, que reduz o fluxo de sangue e contribui para o desenvolvimento de trombose e sangramento. Além disso, o hematócrito elevado e a rigidez de eritrócitos promovem o transporte das plaquetas e dos fatores de

coagulação no sentido da parede vascular, gerando colisões com a vasculatura e entre elas mesmas [124, 133].

Nos eritrócitos, devido ao seu papel fisiológico como transportadores de oxigênio, o ambiente intracelular é rico em hemoglobina (Hb), que desempenha um papel central nos processos bioquímicos com uma ação inibitória sobre o NO [127]. Quando a Hb atua como um carreador para o NO, tem-se o S-nitroso hemoglobina (SNO-Hb) como uma forma de armazenamento de NO, limita a disponibilidade deste na circulação para a vasodilatação, a regulação da função plaquetária e do fluxo sanguíneo [24, 126].

O NO exógeno ao sofrer difusão do endotélio para o sangue, liga-se à Hb e reage rapidamente com o heme, que possui afinidade pelo NO muito maior do que pelo oxigênio. Através dessa rápida reação com a oxi-hemoglobina (OxiHb, $Fe^{II}O_2Hb$) o NO é inativado e convertido a met-hemoglobina (MetHb, $Fe^{III}Hb$) e nitrato (NO_3^-). Assim, com a desnaturação da Hb por oxidação, há a precipitação das cadeias de globina que se libertam do heme (formam os corpúsculos de Heinz) e gera lesão intracelular [134, 135].

Uma vez que a auto-oxidação da Hb gera ânion superóxido que “sequestra” o NO, os eritrócitos estarão sob um estresse oxidativo intracelular constante, caso essa capacidade oxidante supere a eficiência do sistema antioxidante. Dessa forma, o componente lipídico da membrana eritrocitária estará sujeito à agressão oxidativa (lipoperoxidação), o que pode promover a lesão da membrana e culminar em hemólise [136]. Nesse sentido, além de desintoxicar oxidantes gerados endogenamente, os eritrócitos são capazes de agir como um dissipador de H_2O_2 extracelular (por exemplo em neutrófilos), a partir da dismutação de superóxidos em H_2O_2 pela SOD [137, 138].

1.4 **A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo em TDM**

O NO através da modulação de diferentes reações bioquímicas desempenha um papel importante em processos fisiológicos no cérebro, logo, tem sido implicado na neurotransmissão, neuromorfogênese, plasticidade sináptica, regulação de expressão genética, modulação dos comportamentos sexuais e agressivos, aprendizagem, percepção de dor, agressividade e, sobretudo, na depressão [139].

Dentro do cérebro, uma das isoformas das enzimas sintetizadoras de NO, a nNOS, é encontrada em muitas áreas associadas com o estresse e a depressão, a saber, hipocampo, hipotálamo, núcleo rafe dorsal, locus coeruleus [140, 141]. No entanto, o nível de NO estaria diminuído na região do locus coeruleus de pacientes que sofrem de TDM [142].

Nesses pacientes, observa-se hiperatividade hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e aumento dos níveis de cortisol, que poderiam ser responsáveis, ao menos parcialmente, por anormalidades na produção de NO pelo endotélio, que por sua vez, pode mediar alguns dos efeitos cardiovasculares deletérios [52, 143]. Os altos níveis de cortisol levariam à diminuição da atividade da NOS, o que promoveria aceleração na lesão de células do endotélio vascular e o desenvolvimento de aterosclerose [52, 144]. Adicionalmente, há redução nos níveis basais de metabólitos de NO plasmáticos observados em depressivos, comparável ao que resulta dos fatores convencionais de risco para DCV [10].

Ao analisar a via L-arginina-NO no TDM, estudos anteriores, incluindo o realizado por nosso grupo, demonstraram uma diminuição do transporte de L-arginina via sistema y^+L, da atividade da NOS, e dos níveis de GMPc em plaquetas e uma hiperagregabilidade plaquetária [9, 10]. Vários estudos têm demonstrado o aumento da ativação das plaquetas em indivíduos com depressão, comparados com controles saudáveis, o que reforça um importante papel do NO derivado tanto do endotélio quanto das plaquetas na regulação destas [145, 146]. Assim como acontece com os hipertensos, o envolvimento do NO nas alterações da função plaquetária pode predispor o paciente a eventos trombóticos [129, 147].

Estudos sugerem que essa diminuição da produção de NO em pacientes TDM seria independente dos níveis de colesterol, mas poderia se dar, por exemplo, devido a um aumento das concentrações de inibidores endógenos da NOS endotelial, como o ADMA [10, 148].

A biodisponibilidade de NO também é afetada na depressão, por uma superprodução de radicais livres que mediam os danos e a destruição dos principais componentes da estrutura celular. Há um desequilíbrio oxidativo com o excesso de produção das EROs, que consequentemente pode levar a: dano oxidativo nas membranas dos eritrócitos pela diminuição do acido graxo ômega-3, elevada peroxidação lipídica, dano oxidativo em DNA, redução sérica de vitamina A e E,

lesões celulares, apoptose, carbonilação de proteínas e respostas auto-imunes prejudiciais [148-152].

O paciente com TDM apresenta níveis de enzimas antioxidantes elevados, provavelmente, como uma tentativa compensatória de proteger o organismo contra agentes oxidantes. Entre estes mecanismos de defesa estão as enzimas SOD, CAT e GPx. A SOD catalisa a conversão de O_2^- em H_2O_2 e O_2. A GPx pode reduzir o H_2O_2 livre para água. Enquanto a CAT catalisa H_2O_2 em água e O_2. A partir da medição de seus níveis, estejam elas aumentadas ou diminuídas, podem-se avaliar indiretamente as EROs.

Enfim, vale destacar a importância deste estudo em propor uma análise da via L-arginina-NO e o estresse oxidativo nos demais elementos figurados do sangue, como: eritrócitos e neutrófilos, para um melhor entendimento do envolvimento destes e das plaquetas nos processos inflamatórios, até mesmo aterosclerose no TDM [153-156].

1.5 **Relação entre inflamação, NO e DCV no TDM**

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo a uma infecção ou lesão dos tecidos, que faz parte da resposta imune inata. A resposta celular ao processo inflamatório é mediada por monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas, entre outras. Durante esse processo, o NO, uma importante molécula imunoreguladora produzido pela iNOS, e as EROs atuam mediando a citotoxicidade para a manutenção da homeostase do organismo [157-159].

O estresse oxidativo, gerado por um desequilíbrio entre o grande aumento das EROs e a diminuição das defesas antioxidantes, é o principal determinante da crônica remodelação patológica da parede vascular, que depende, pelo menos em parte, da interação do complexo celular constituído de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, e levaria a um risco de aterotrombose [160].

Os neutrófilos, tipo mais comum de leucócitos no sangue, são a primeira linha de defesa contra a invasão de micro-organismos e apresentam um papel essencial na inflamação. Um dos seus principais sistemas de defesa corresponde a sua capacidade de iniciar o “Burst” oxidativo com a consequente produção das

EROs que têm uma função de destaque na modulação das reações inflamatórias [161].

Em diversos estágios do processo inflamatório, o NO possui um papel regulador na liberação dos hormônios envolvidos nesse controle, nas propriedades pró-inflamatórias do endotélio, na migração de células para o sítio inflamatório e efeito antiapoptótico. Porém, grandes quantidades de NO e de $O_2^{\bullet-}$ são produzidas juntamente, e podem reagir e formar $ONOO^-$, um mediador potente dos efeitos citotóxicos do NO como, o dano ao DNA, a mediação da peroxidação lipídica, incluindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) colesterol, dentre outros [162, 163].

Essa modificação oxidativa da LDL, por efeito do NO, pode desencadear uma disfunção endotelial e uma inflamação da parede vascular, e originar um evento agudo por ruptura da placa ou trombose. Por outro lado, a lipoproteína de alta densidade (HDL) possui propriedade anti-inflamatória, pela remoção do excesso de colesterol das células das artérias e, portanto, protege contra a aterosclerose [164, 165].

Outro ponto importante em relação à resposta inflamatória é o aumento da produção de citocinas sejam elas pró- (por ex.: fator de necrose tumoral alfa - TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8) ou anti-inflamatórias (ex.: IL-10, fator de transformação do crescimento beta - TGF-β). Algumas citocinas inflamatórias promovem um aumento nas proteínas inflamatórias de fase aguda, tais como o fibrinogénio [166]. Porém, certas citocinas pró-inflamatórias podem ter suas expressões inibidas e sua ativação sobre as células endoteliais limitadas pelo NO, o que reforça a sua importância como um regulador de tráfico inflamatório na parede do vaso [167].

Estudos mostram que as citocinas, incluindo as circulantes TNF-α e IL-6, podem alterar a biodisponibilidade de NO. Ao contribuir para a modulação da via L-arginina-NO através de indução da iNOS e de transportadores de L-arginina na vasculatura e no miocárdio, podem aumentar a produção de NO. No entanto, se agirem diretamente sobre eNOS ou estimularem a atividade da enzima arginase, diminuirão a síntese de NO [168].

A inflamação e a secreção de citocinas pró-inflamatórias podem mediar a associação da depressão com a progressão aterosclerótica. Achados de meta-análises e outros estudos demonstraram diversos fatores relacionados ao aumento da inflamação em pacientes com depressão. Os níveis sanguíneos de citocinas pró-

inflamatórias e seus receptores, tais como IL-1β, IL-6, interferon gama (IFN-γ) e TNF-α, apresentam-se elevados. No plasma identificaram aumento nos níveis de proteínas de fase aguda, como haptoglobina e proteína C reativa, bem como no número e na atividade de células do sistema imunológico, os neutrófilos no sangue periférico. Entretanto, observou-se uma redução do número de linfócitos e da atividade de células natural killers (NK), assim como os níveis de melatonina à noite, em oposição aos níveis de cortisol aumentados de dia. O cortisol, por sua vez, induz uma baixa regulação da atividade de eNOS em células endoteliais e uma diminuição dos níveis de NO no plasma [30, 169-172].

Diversos estudos exibiram resultados contraditórios sobre as alterações envolvidas na relação das citocinas com a depressão [173, 174]. Porém, vale destacar as diversas evidências de que a ação das citocinas afeta o sono, o apetite, o comportamento sexual, a memória e a atividade motora, nessa patologia [175]. Isto reforça os efeitos de um desequilíbrio nas respostas imuno-inflamatórias e sua relação com o sistema nervoso sobre a fisiopatologia de diversas doenças neuropsiquiátricas como TDM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar a via L-arginina-NO e marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos e neutrófilos, e analisar os efeitos destes últimos na agregação plaquetária de pacientes com transtorno depressivo maior (TDM).

2.2 Objetivos específicos

Em neutrófilos:

a) Avaliar o transporte da L-arginina total, via sistemas y^+ e y^+L;
b) Aferir os níveis de GMPc;
c) Quantificar a atividade da NOS e a expressão da eNOS e iNOS;
d) Investigar a expressão da NADPH gp91phox;
e) Avaliar o efeito da incubação dos neutrófilos com plaquetas, em tempos diferentes, na agregação plaquetária induzida por ADP;
f) Mensurar as concentrações de aminoácidos em lisado de células;
g) Medir o *"burst"* oxidativo em neutrófilos estimulados com acetato miristato de forbol (PMA).

Em eritrócitos:

a) Avaliar o transporte total de L-arginina;
b) Aferir os níveis de GMPc;
c) Quantificar a atividade da NOS e a expressão da eNOS e iNOS;
d) Investigar os efeitos do TDM na fragilidade osmótica;
e) Medir a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase;
f) Determinar a presença do dano oxidativo, através da carbonilação de proteínas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Estudo experimental transversal (dezembro de 2012 a maio de 2015) com a participação de 14 pacientes com diagnóstico de Transtorno Depressivo Maior – TDM (12 mulheres e 2 homens; 27 ± 2 anos de idade) e o grupo controle composto por 15 indivíduos saudáveis (11 mulheres e 4 homens) pareados por sexo, idade (29 ± 2 anos), raça e escolaridade (Tabela 1).

3.2 Seleção de sujeitos

O recrutamento foi realizado através da divulgação da pesquisa por cartazes na Universidade do Estado do Rio de Janeiro UERJ. O grupo controle consistiu de sujeitos saudáveis com histórico familiar negativo para transtornos psiquiátricos.

Foi realizada uma entrevista inicial com a psicóloga responsável, visando à obtenção dos dados pessoais, histórico de vida, verificação dos critérios de inclusão/exclusão e o diagnóstico de TDM.

A priori para participar, o paciente precisava apresentar o diagnóstico de depressão que explora os principais Transtornos Psiquiátricos do Eixo I do DSM IV-TR (não o DSM-V que entrou em vigor no ano de 2013); e ter idade entre 20 e 50 anos, sendo considerados adultos jovens.

Os critérios de exclusão foram:

a) ser portador de outros transtornos psiquiátricos;
b) ser portador de doenças crônicas, tais como diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, hipo ou hipertireoidismo, alcoolismo, obesidade ou desnutrição, cardiopatia isquêmica e insuficiência cardíaca;
c) apresentar infecções nem ser tabagista;
d) fazer uso de medicamentos antiplaquetários, anticoagulantes, corticoides e/ou drogas psicotrópicas;
e) estar em processo psicoterápico para a depressão;
f) ter realizado transfusão de sangue e hemoderivados ou nos últimos 3 meses.

Tabela 1 – Critérios de exclusão apresentados por sujeitos entrevistados.

Critérios de exclusão	**Sexo**	**n**
Ansiedade e / ou anemia	2H/6M	8
Obesidade	1H/4M	5
Tabagismo	1M	1
Transtorno bipolar grave	1H/1M	2
Anorexia e fumante	1M	1
Tireoidite de Hashimoto	1M	1
Traço falciforme	1M	1
Esteatose hepática (primeiro grau)	1M	1
Hipertensão	1M	1
Uso de medicamentos	2H/3M	5
TOTAL	6H/20M	26

Legenda: homens (H) e mulheres (M)

Previamente à realização de qualquer procedimento experimental, todos os sujeitos receberam informações e explicações verbais sobre o estudo e assinaram voluntariamente o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO A), além de preencherem uma ficha clínica (ANEXO B). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (1436-CEP/HUPE) (ANEXO C) e a investigação foi conduzida de acordo com a declaração de Helsinki (Associação Médica Mundial, revisado em 2008).

Foram entrevistados 48 sujeitos que possuíam interesse em participar do estudo por apresentarem os sintomas que os enquadrariam no TDM (de acordo com a classificação do DSM-IV), porém, 27 foram excluídos considerando as restrições anteriormente enumeradas e 7 abandonaram o estudo, mesmo após terem assinado o termo de consentimento.

3.3 **Testes quantitativos para o TDM**

Foram aplicados como instrumentos para quantificação e classificação do diagnóstico da depressão (Tabela 3):

- O Inventário de Beck para a depressão [176], um questionário auto-informativo com 21 itens, que produz uma pontuação total variando de 0 a 63. Cada item é classificado numa escala de 0 a 3, com o 0 representando “ausência” e 1 a 3 representando níveis crescentes da severidade do sintoma. É respondido pelo paciente e classifica a TDM de leve (10 a 16 pontos) a moderada (17 a 29 pontos) e grave (30 a 63 pontos). (ANEXO D);
- A Escala de Hamilton [177], composta por 23 itens, cujos valores da escala de classificação para TDM podem variar entre leve (7 a 17 pontos) a moderada (18 a 24 pontos) e grave (> 24 pontos). Uma entrevista estruturada para avaliar a gravidade da depressão, de acordo com os critérios do DSM-IV-TR (ANEXO E).

3.4 **Avaliação Laboratorial**

Após a coleta de sangue de pacientes e controles em jejum de 12h (exceto água), as análises bioquímica e hematológica foram realizadas no Laboratório Central do Hospital Universitário Pedro Ernesto (Tabela 2).

3.5 **Isolamento e preparo dos neutrófilos**

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção e transferidas para tubos de polipropileno, contendo o anticoagulante heparina. Os polimorfonucleares (PMNs) foram isolados por um gradiente de densidade composto por uma camada de Histopaque® 1119 e Histopaque® 1077 (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). O sangue foi colocado em cima das duas camadas de histopaque e centrifugados (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Alemanha) a 700 x *g* por 30 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, os PMNs foram coletados, lavados com PBS (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, KCl 2.7 mM) e centrifugado a 600 x *g* por 10 min a 4ºC. Ao pellet foi adicionado água gelada para lisar os eritrócitos e a suspensão foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Alemanha) novamente a 600 x *g* por 10 min a 4ºC. Ao final, o *pellet* de PMNs foi ressuspenso em PBS e a contagem e viabilidade das células foram analisadas na câmara de Neubauer no Microscópio (Eclipse E200, Nikon).

Em todos os experimentos houve ajuste para o mesmo número de células.

3.5.1 Transporte de L-arginina em neutrófilos

O influxo de 1 mM de L-[^{3}H]-arginina (Perkin Elmer, MA, EUA) foi medido (concentração final 2 μM). O transporte total foi fracionado nas vias sistema y^{+} e y^{+}L através da inibição do y^{+}L com 100 μM de aminoácido neutro L-leucina. O influxo foi medido a 37°C (durante um período de 3 minutos) pela adição de 200 μL de suspensão de células em 700 μL de tampão PBS contendo 6 μL L-arginina fria [1 mM] e 10 μL radioativa.

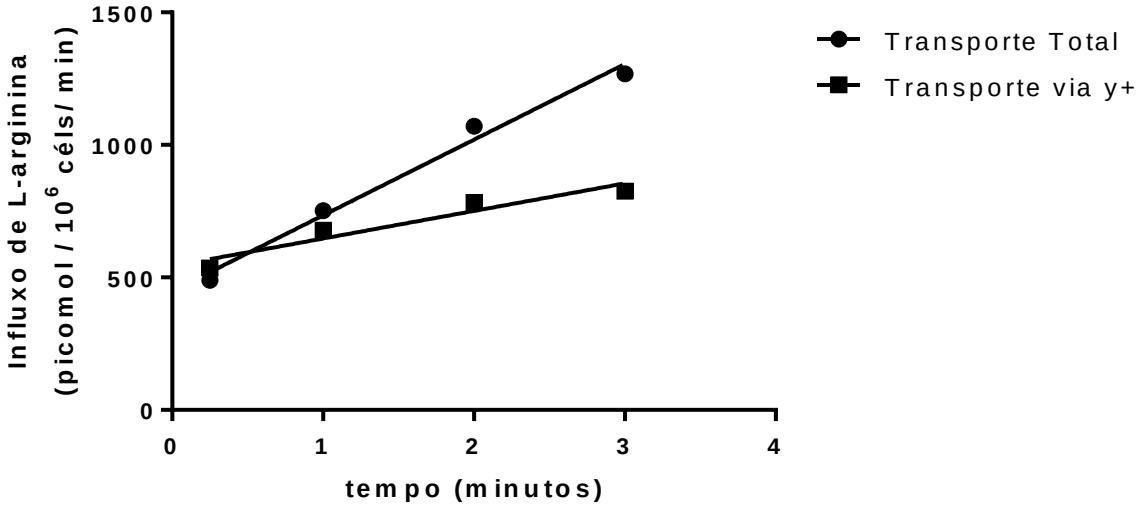
Posteriormente, alíquotas de 200 μL foram retiradas em 15 segundos, 1, 2 e 3 minutos, e colocadas em microtubos contendo 50 μL de óleo (na proporção de 3 vol dibutil phatalate: 2 dinonyl phatalate) e centrifugados por 15 s a 10000 x *g* (microcentrífuga Eppendorf 5417 C/R). Este processo separa as células do sobrenadante.

Os padrões foram preparados através de uma alíquota de 20 μL do sobrenadante. O sobrenadante e o óleo foram aspirados do tubo e o mesmo foi mantido no freezer -20ºC. O tubo contendo o *pellet* de células foi colocado em tubos contendo 2 mL de líquido de cintilação. A medida da radioatividade foi feita, após 24h, através do cintilador β (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA).

3.5.1.1 Cálculo do influxo

O influxo de L-arginina foi medido ao longo de três minutos usando uma regressão linear. A taxa inicial de transporte foi calculada usando uma inclinação linear.

Gráfico 1 – Cinética temporal do influxo de L-arginina (1 mM) nos neutrófilos.



A taxa inicial do transporte foi calculada e expressa em picomol / 10^6 céls/ minutos. A equação para o cálculo do influxo é:

$$\textbf{Taxa inicial} = \frac{\textbf{inclinação da linha x [AA] x } V_{padrão}}{\textbf{Radioatividade}_{padrão} \textbf{ x n}}$$

Sendo:

[AA] concentração do aminoácido presente no padrão

$V_{padrão}$ = volume do padrão

n= número de células presente no *pellet* da amostra

3.5.2 Avaliação da atividade da óxido nítrico sintase em neutrófilos

A atividade de NOS foi avaliada pela conversão de L-[^{3}H]-arginina em L-[^{3}H]-citrulina.

A L-[^{3}H]-arginina (1 mM) foi adicionada à suspensão de neutrófilos, e posteriormente foi realizada uma pré-incubação com um análogo da L-arginina, L-NMMA (10 mM), por 120 minutos 37ºC. A reação foi interrompida por rápida centrifugação (10000 x *g* por 15 s, microcentrífuga Eppendorf 5417 C/R) seguida por lavagem com solução de PBS. Os neutrófilos foram lisados com Triton 0,1 % e transferidos para uma coluna contendo a resina catiônica Dowex, que retém a L-[^{3}H]-arginina não metabolizada e permite a passagem da L-[^{3}H]-citrulina..

A L-[^{3}H]-citrulina foi então removida para tubos de cintilação, 1 mL do líquido cintilante adicionado e a radioatividade contada no cintilador β (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA)

3.5.3 Produção de monofosfato de guanosina cíclica em neutrófilos

Inicialmente, os neutrófilos (1x10^{7} céls/mL) foram centrifugados 5000 rpm por 5 min (Eppendorf Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha), ressuspensos em tampão TRIS 100 mM e pré-incubados com 16 μL de isobutilmetilxantina – IBMX 50 mM (inibidor de fosfodiesterase) por 30 minutos. Foi adicionado o ácido perclórico puro à suspensão de neutrófilos, seguido de centrifugação 6000 x *g* por 20 min (Eppendorf Centrifuge 5417 C, Eppendorf AG, Alemanha). Os sobrenadantes contendo GMPc foram coletados e estocados a -80°C (Thermo Scientific Forma 900 series, EUA), até a leitura por um ensaio enzimático (Cyclic GMP EIA kit, Cayman Chemical Company, MI, EUA), utilizando o leitor de placas (FLUOstar Omega BMG labtech).

3.5.4 Mensuração da dosagem de proteínas em neutrófilos

A mensuração das proteínas foi feita através de um ensaio colorimétrico, utilizando-se o kit BCA ^{TM} Protein Assay (BioAgency, São Paulo, Brasil).

3.5.5 Extração de proteínas e western blotting em neurófilos

Foi avaliada a expressão intracelular PMNs das enzimas eNOS, iNOS e subunidade da NADPH gp 91 phox através da técnica de Western Blotting.

Os PMNs foram isolados e lisados com um tampão de lise e armazenado a -80^{o}C (Thermo Scientific Forma 900 series, EUA) até a sua utilização. A quantificação de proteína foi feita pelo método previamente descrito. As amostras contendo 20 μg de proteína dos PMNs lisados foram suspensas em tampão NuPage após desnaturação das proteínas por incubação a 70^{o}C por 10 minutos (Tchen Dri-Block CB- 3D, Sigma Chemical, St. Lois, EUA).

As proteínas foram fracionadas por eletroforese (200 V, 100 mA, 40 min) em gel poliacrilamida NuPAGE® Novex Bis-Tris 10 % (Invitrogen, Califórnia, EUA)

utilizando-se tampão de corrida [concentrado 5 x (250 mM MOPS, 250 mM Tris, 5 mM EDTA, 17,3 mM SDS)], e transferidas (15 V, 328 mA, 40 min) para membranas de PVDF (Invitrogen, Califórnia, EUA) em tampão de transferência (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 1,3 mM SDS).

Foram utilizados anticorpos primários monoclonais na concentração de 1:1000 para eNOS, iNOS (BD Biosciences, NJ, EUA), e 1:500 para a subunidade da NADPH gphox 91 (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA). A tubulina e a beta-actina foram utilizadas como controle de quantidade de proteína nas amostras na concentração de 1:1000. O procedimento empregado para a detecção de bandas foi a incubação com ECL (Amersham-Biosciences Buckinghamshire, UK). Foram utilizados como padrão de peso molecular o Full-Range Rainbow^{TM} Molecular Weight Marker (GE Healthcare, EUA).

As intensidades das bandas foram normalizadas para a intensidade da banda de tubulina para eNOS e iNOS e beta-actina para NADPH gp91 phox correspondente por análise densidométrica. A quantificação de imagens foi realizada com o programa image *J* (ImageJ 1.43, National Institutes of Health, EUA).

3.5.6 "Burst" oxidativo

Esse experimento baseia-se na quantificação da geração de ânion superóxido no *"burst"* oxidativo dos neutrófilos, que utiliza como sonda luminescente específica a lucigenina (Nitrato bis-N-metil acridina). A reação acontece quando a lucigenina reage com o ânion superóxido e forma uma molécula excitada que emite luz ao voltar ao seu estado fundamental. O "*burst*" ocorre através do estímulo da enzima NADPH com o PMA (13 acetato - 12 miristato de forbol), e a enzima superóxido dismutase (SOD) tem a função de dismutar o ânion superóxido que reage com a lucigenina.

Os neutrófilos foram obtidos do sangue periférico e ajustados a uma concentração de 3 x 10^6 céls/mL com tampão PBS. Na microplaca foram adicionados 150 μL da suspensão de células, 50 μL de lucigenina (5 μM), 50 μL de PMA (20 ng/poço) para estimular o "*burst"* oxidativo e 20 μL de SOD (500 U/mL). A reação foi monitorada no intervalo de 120 min com leituras a cada 2 min. As leituras de luminescência foram feitas no luminômetro (FLUOstar Omega BMG labtech).

3.5.7 Dosagem de aminoácidos em neutrófilos

Os neutrófilos foram separados e contados em câmera de Neubauer. Foram separadas alíquotas de suspensão de neutrófilos em concentrações de, aproximadamente, 9 x 10^6 céls/ml.

Posteriormente, a alíquota foi centrifugada a 3000 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao pellet de neutrófilos foi adicionado 1 mL da solução de Triton 10 % para lisar as células. As alíquotas de células lisadas foram armazenadas e enviadas ao laboratório de análise DLE (Rio de Janeiro, Brasil). A dosagem quantitativa e qualitativa dos aminoácidos foram realizadas por cromatografia líquida de ultra performance - UHPLC (Tabela 4).

3.6 **Isolamento e preparo de plaquetas**

As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo citrato de sódio (3,8 %, 9:1 v/v) e centrifugadas (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Alemanha) a 250 x *g* por 15 min em temperatura para obter o plasma rico em plaquetas (PRP), após retirar o plasma rico o mesmo sangue foi centrifugado novamente a 900 x g por 10 minutos a temperatura ambiente para obter o plasma pobre em plaquetas (PPP). A contagem do PRP foi feita no contador de células (ABX Pentra 60, Horiba Medical, Japão) e a concentração de plaquetas do PRP foi ajustada para 3 x 10^8 céls/mL com PPP.

3.6.1 Agregação de plaquetas e neutrófilos

O efeito dos PMNs na agregação plaquetária foi analisado através da incubação do PRP (3 x 10^8/ml) com PMNs (4 x 10^6 céls/ml) por 5 e 30 minutos. A agregação basal foi analisada pela incubação do PRP com o tampão PBS, no qual os PMNs foram resuspensos. A agregação induzida por ADP (5 μM) foi monitorada durante 5 minutos num agregômetro de 4 canais (Chrono-Log, Havertown, CA, EUA). Os testes foram realizados a 37ºC numa velocidade de rotação de 900 rpm. A agregação máxima foi expressa em percentual.

3.7 **Isolamento e preparo de eritrócitos**

Após a coleta do sangue, separação e retirada dos neutrófilos, os eritrócitos restantes no fundo do tubo falcon foram lavados 3 x com solução salina (NaCl 0,9 %), seguido de centrifugação (Centrifuge PK 120, ALC) a 3000 rpm por 5 min e realizada a fragilidade osmótica. Após as lavagens, em um tubo falcon foi adicionado 3 ml do concentrado de eritrócitos + 4 ml de solução salina para posterior análise da atividade da NOS e estresse oxidativo. O restante foi resuspenso até o volume do tubo falcon (15 ml) e os eritrócitos incubados a 37°C por 3 h para eliminar a *trans*-estimulação, subsequentemente foram lavados com solução salina 3 x novamente e centrifugados para o transporte da L-arginina.

3.7.1 Transporte de L-arginina em eritrócitos

A suspensão de eritrócitos foi incubada por 20 min a 37°C, seguida de lavagem com solução salina. As células foram resuspensas em solução salina. A seguir, L-arginina tritiada (5-500 µM) foi adicionada às alíquotas de suspensão e incubadas então, por 5 minutos a 37ºC. O transporte de L-arginina foi interrompido através do resfriamento rápido e em seguida as células foram lavadas com uma solução de $MgCl_2$ ($MgCl_2$ 107 mM + MOPS 10 mM) e centrifugadas (Mikro 22 R, Hettich zentrifugen). Finalmente, os eritrócitos foram lisados com Triton X-100 (0,1 %) e as proteínas precipitadas com ácido tricloroacético (10 %). Após centrifugação (Mikro 22 R, Hettich zentrifugen), o sobrenadante foi transferido para tubos de cintilação e a radioatividade contada através de um aparelho de contagem de cintilação β (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA).

A cinética de um transporte mediado por um carregador é a expressão da equação de Michaelis-Menten.

$$V = \frac{[S] . V_{máx}}{K_m + [S]}$$

Na qual:

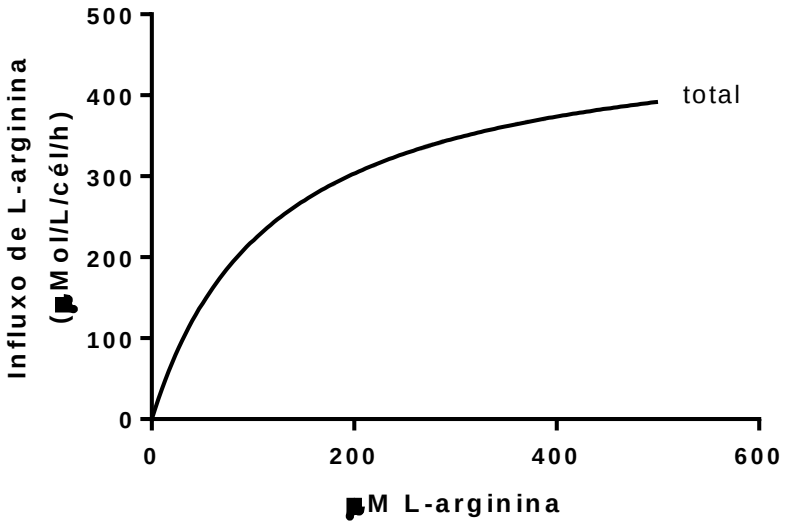
V= velocidade do fluxo

$V_{máx}$= velocidade máxima do fluxo

[S] = concentração do substrato

K_m = concentração do substrato que corresponde à metade do $V_{máx}$

Gráfico 2 – Exemplo ilustrativo da curva de saturação do sistema de transporte de L-arginina.



Para o cálculo da equação de Michaelis-Menten e para determinar o $V_{máx}$, K_m, foi utilizado o programa comercial GraphPad Prism 6.0.

3.7.2 Mensuração da atividade da óxido nítrico sintase em eritrócitos

A atividade de NOS foi acessada pela conversão de L-[^{3}H]-arginina em L-[^{3}H]-citrulina. A suspensão de eritrócitos foi incubada na presença de L-[^{3}H]-arginina (10 mM) por 60 minutos. A reação foi interrompida por rápida centrifugação (14000 rpm por 1 min, microcentrífuga Eppendorf 5417 C/R) seguida por lavagem com solução de $MgCl_2$. As células lisadas com Tryton 0,1 % e as proteínas precipitadas com ácido tricloroacético (TCA 10 %). As amostras foram então centrifugadas (14000 rpm por 10 min, microcentrífuga Eppendorf 5417 C/R) e o sobrenadante transferido para uma coluna contendo a resina Dowex. L-[^{3}H]-citrulina removida para tubos de cintilação, 1 mL do liquido cintilante adicionado e a radioatividade contada (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Counter Inc., California, EUA).

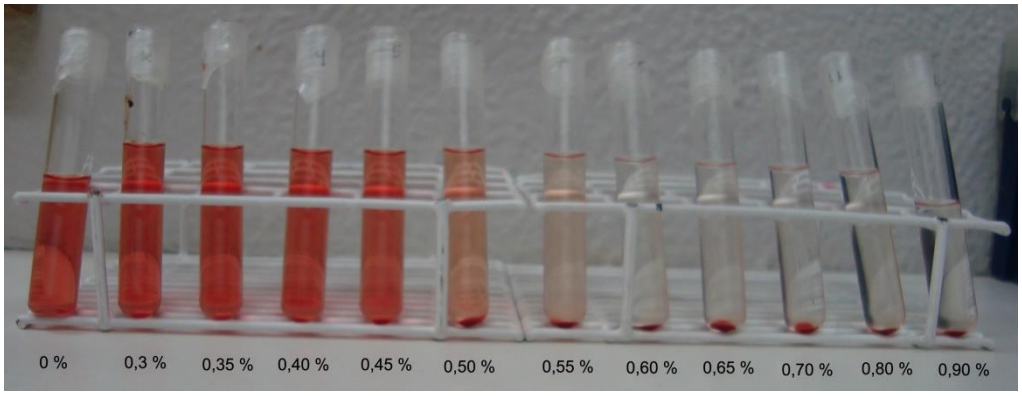
3.7.3 Produção de monofosfato de guanosina cíclica em eritrócitos

Inicialmente, os eritrócitos foram pré-incubados com IBMX 10 mM (inibidor de fosfodiesterase) por 30 minutos. Em seguida, o ácido perclórico (1 M) foi adicionado à suspensão de eritrócitos, as células foram congeladas rapidamente em nitrogênio e, a seguir, lisadas em ultrassom (MaxiClean 1400, Unique, São Paulo, Brasil), por 15 minutos. Posteriormente, as células fragmentadas foram centrifugadas (Mikro 22 R, Hettich zentrifugen), 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outro micro-tubo e adicionado KOH 8 M e centrifugado novamente. Os sobrenadantes contendo GMPc foram coletados e estocados a -80°C (Thermo Scientific Forma 900 series, EUA), até a leitura por um ensaio enzimático (Cyclic GMP EIA kit, Cayman Chemical Company, MI, EUA), utilizando o leitor de placas (FLUOstar Omega BMG labtech).

3.7.4 Fragilidade osmótica

Após as células serem lavadas com solução salina, uma alíquota de 12,5 µl de sedimentação de eritrócitos foi adicionada a tubos de ensaio contendo uma solução com diferentes concentrações de NaCl (0 a 0,9 %) (figura 7).

Figura 7 – Registro da hemólise provocada por diferentes concentrações de NaCl.



Fonte: A AUTORA, 2012.

Os tubos foram homogeneizados e as amostras incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período os tubos foram então

centrifugados por 5 minutos a 1200 rpm (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Alemanha). Os sobrenadantes foram então isolados e transferidos para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura das densidades óticas (DO) em um leitor de microplacas (FLUOstar Omega, BMG labtech) a 540 nm. A DO do tubo contendo apenas água foi considerada como 100 % de hemólise e a partir daí foram calculadas as porcentagens de hemólise das demais concentrações de NaCl. Após o cálculo das porcentagens de hemólise, foram plotadas curvas de fragilidade com os valores de hemólise e sua concentração de NaCl correspondente . Foi utilizado o software GraphPad Prism 6.0 para o cálculo da concentração de NaCl responsável por 50 % de hemólise (IC50) utilizando uma função do tipo 4-parâmetros.

3.7.5 Avaliação do estresse oxidativo em eritrócitos

3.7.5.1 Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi estimada pela inibição da auto-oxidação do piragolol.

Em cubetas estranguladas foram adicionados volumes decrescentes de tampão Tris-HCl (0,05 M de Tris-HCl + 1 mM de EDTA): 980 µL, 970 µL, 960 µL 950 µL 940 µL somados a volumes crescentes de SOD (U/mL): 10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl e 50 µl, e mais 10 µL de piragolol (20 mM em 10 mM de HCl), para a curva da SOD. Em seguida, repetiu-se o volume de 970 µL do tampão acima, mas ao invés de volumes crescentes de SOD, foram adicionadas 20 µl de cada amostra de suspensão de eritrócitos (200 µg).

A atividade da enzima foi medida por análise cinética com duração de 5 min e a leitura realizada em intervalos de 10 segundos, numa absorbância de 325 nm no espectrofotômetro (Fluoestar Omega BMG labtech). Os valores foram analisados em uma planilha do Excel e os resultados foram apresentados em U SOD/mL.

3.7.5.2 Glutationa peroxidase

A medida da glutationa peroxidase foi feita a partir da taxa de decaimento da NADPH.

Inicialmente foi preparada uma solução de uso fotossensível (20 mL tampãp fosfato+ 4 mL de Glutationa Redutase + 4 mL de Glutationa reduzida + 1 mL de azida sódica). A reação foi feita em cubetas nas quais foram adicionados 1400 µL da solução de uso + 200 µL da suspensão de eritrócitos e incubados por 10 min. Em seguida, foram adicionados 200 µL de NADPH e 200 µL de H_2O_2) e a leitura realizada por 5 minutos.

A leitura foi feita em comprimento de onda de 340 nm no espectrofotômetro (Fluoestar Omega BMG labtech). Os valores foram analisados em uma planilha do Excel e os resultados foram apresentados em mM/min/mg Hemoglobina.

3.7.5.3 Catalase

O ensaio é baseado na capacidade que a catalase apresenta de catalisar a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na reação, uma das moléculas do H_2O_2 é oxidada e a outra é reduzida, formando oxigênio molecular e água, respectivamente.

Foi preparado um tampão de peróxido de hidrogênio (25 mL de PBS para 40 µL de H_2O_2). Na cubeta de quartzo foram adicionados 2000 µL do tampão com peróxido de hidrogênio, e em seguida 2 µL de eritrócitos. A leitura foi realizada nos tempos de 0, 30 e 60 segundos, numa absorbância de 240 nm no espectrofotômetro (Fluoestar Omega BMG labtech).

Os valores foram analisados em uma planilha do Excel e os resultados foram apresentados em U de catalase/mg de hemoglobina.

3.7.5.4 Carbonilação de proteínas

Este ensaio foi utilizado para avaliar a degradação de proteínas em eritrócitos, e baseia-se no princípio de que os resíduos de proteínas (histidina, arginina, lisina e prolina) são oxidados por radicais livres e formam produtos com o grupo carbonil, que pode ser detectado através da reação com 2,4 dinitropheniylhidrazina (DNPH).

Foram utilizados 100 µL de eritrócitos em duplicata. As alíquotas foram lavadas com solução de TCA 10 %. Uma das duplicatas foi incubada com HCl 2 M e a outra com DNPH diluído em HCl 2 M, ambas por 10 min. Foram lavadas novamente com TCA 10 % e 3 vezes com Etanol-Acetato de Etila, respectivamente.

Entre cada lavagem as amostras foram passadas no vortex e centrifugadas (Mikro 22 R, Hettich zentrifugen) por 2 min a 2000 x *g* e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foi adicionada guanidina 6M às amostras e estas foram centrifugadas 5000 x *g* por 3 min.

A leitura foi feita em comprimento de onda de 370 nm no espectrofotômetro (Fluoestar Omega BMG labtech). Os valores encontrados nas duplicatas que foram incubadas com DNPH foram descontados do encontrado nas amostras incubadas com HCl. Os resultados obtidos foram apresentados em nmol/mg de Hemoglobina.

3.8 **Análise estatística**

Os dados estão apresentados na forma de média e erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram testadas utilizando o teste *t* independente, com exceção dos dados de agregação e de atividade da óxido nítrico sintase. Nesses casos, os resultados foram comparados com uma análise de variâncias de duas entradas (condição clínica x meio de incubação) com medidas repetidas no segundo fator. Em caso de F significativo, foi aplicado um pós-teste de Holm-Sidak para identificar as diferenças. As premissas de normalidade, homogeneidade de variâncias e esfericidade foram testadas com os testes de Shapiro-Wilk, Levene e Mauchly, respectivamente.

A análise dos dados e a preparação dos gráficos foram realizadas através do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., CA, EUA). A significância estatística foi determinada quando $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas de pacientes deprimidos e sujeitos controles saudáveis

A Tabela 1 apresenta características demográficas dos controles saudáveis e dos pacientes com transtorno depressivo maior (TDM).

Como observado nesta tabela, o grupo de pacientes com TDM constituía-se de adultos jovens, sendo a maioria do sexo feminino, de etnia branca e com nível superior de escolaridade.

Tabela 2 – Características demográficas dos controles saudáveis e dos pacientes com TDM

Dados	**Controles (n=15)**	**TDM (n=14)**	***P***
Idade (anos)	29 ± 2	27 ± 2	0,452
Sexo (n; F/M)	10 F/4 M	12 F/2 M	-
Raça, etnia (branco/ não-branco,%)	87/13	86/14	-
Escolaridade (n; F/M)			
Pós-graduado	6 F/3 M	5 F	-
Superior completo	-	3 F	-
Superior incompleto	4 F	4 F/2 M	-
Médio	1 M	-	-

Legenda: feminino (F), masculino (M).
Nota: Os valores para idade estão representados em média ± EPM.

4.2 Dados laboratoriais e clínicos

A Tabela 2 mostra os dados laboratoriais e clínicos dos pacientes com TDM e dos controles. Ao analisar esses dados, observou-se que os pacientes com TDM apresentaram níveis de eritrócitos, hemoglobina e níveis plasmáticos de fibrinogênio significativamente reduzidos comparados aos controles. Por outro lado,

apresentaram uma quantidade elevada de plaquetas, embora todos estes valores estivessem dentro dos valores considerados normais.

Em relação aos valores de colesterol, glicose e pressão arterial, fatores de risco cardiovasculares convencionais, todos tinham valores dentro da normalidade e semelhantes aos controles.

Tabela 3 – Dados laboratoriais dos controles saudáveis e dos pacientes com TDM

Dados	**Controles (n=15)**	**TDM (n=14)**	***P***
IMC (kg/m²)	21,8 ± 0,8	23,5 ± 0,6	0,089
Eritrócitos (milhão/mm^3)	4,7 ± 0,1	4,3 ± 0,1*	0,004
Hematócritos (%)	40,7 ± 1,2	38,4 ± 0,7	0,092
Hemoglobina (g/dL)	13,7 ± 0,3	12,8 ± 0,3*	0,044
Leucócitos (10^3/mm^3)	6,0 ± 0,6	5,6 ± 0,3	0,566
Neutrófilos (%)	58,9± 2,9	58,1± 1,8	0,786
Plaquetas (10^3/mm^3)	206,6± 1,8	250,8 ± 14,8*	0,030
MPV (fL)	8,81± 0,5	9,4± 0,2	0,306
Colesterol total (mg/dL)	160,1 ± 9,2	175 ± 6,4	0,188
Colesterol HDL (mg/dL)	52,7 ± 3,9	61,6± 4,7	0,175
Colesterol LDL (mg/dL)	92,7 ± 8,7	96,9 ± 6,3	0,689
Triglicerídeos (mg/dL)	100,3± 12,3	84,4 ± 12,6	0,377
Glicose (mg/dL)	87,6 ± 3,7	83,1 ± 1,9	0,276
Sódio (mEq/L)	139,6 ± 0,9	139,4 ± 1,1	0,876
Potássio (mEq/L)	4,1 ± 0,1	4,0 ± 0,1	0,430
Creatinina (mg/dL)	0,86 ± 0,05	0,75 ± 0,04	0,080
Ureia (mg/dL)	27,3 ± 1,9	24 ± 1,6	0,193
Ácido úrico (mg/dL)	4,4 ± 0,9	4,1 ± 0,4	0,766
Pressão arterial sistólica (mmHg)	107,1 ± 3,5	107,2± 2,1	0,970
Pressão arterial diastólica (mmHg)	70,8 ± 2,3	67,7 ± 3,2	0,321
Fibrinogênio (mg/dL)	292,5 ± 22,0	204,9 ± 20,0*	0,013

Legenda: índice de massa corporal (IMC), volume plaquetário médio (MPV), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Nota: Dados representados na forma de média ± EPM, *p ≤ 0,05 vs controle

4.3 **Testes quantitativos para o TDM**

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos com a aplicação dos testes: inventário de Beck (auto-avaliação) e escala de Hamilton, como instrumentos para o auxílio no diagnóstico da depressão durante a entrevista inicial.

Houve a prevalência entre os graus de leve a moderado nos resultados dos testes aplicados para o diagnóstico de transtorno depressivo maior.

Tabela 4 – Resultados dos testes aplicados no diagnóstico do Transtorno Depressivo Maior

Testes	**Pontuação**	**TDM (n=14)**	**%**
Inventário de Beck	24 ± 2		
Leve		4 M	29
Moderado		2 H/5 M	50
Grave		3 M	21
Escala de Hamilton	17 ± 1		
Leve		2 H/6 M	57
Moderado		5 M	36
Grave		1 M	7

Legenda: classificação: homens (H), mulheres (M). Inventário de Beck - leve (10 a 16 pontos) a moderada (17 a 29 pontos) e grave (30 a 63 pontos). Escala de Hamilton - leve (7 a 17 pontos) a moderada (18 a 24 pontos) e grave (> 24 pontos).
Nota: Dados da média da pontuação representados na forma de média ± EPM.

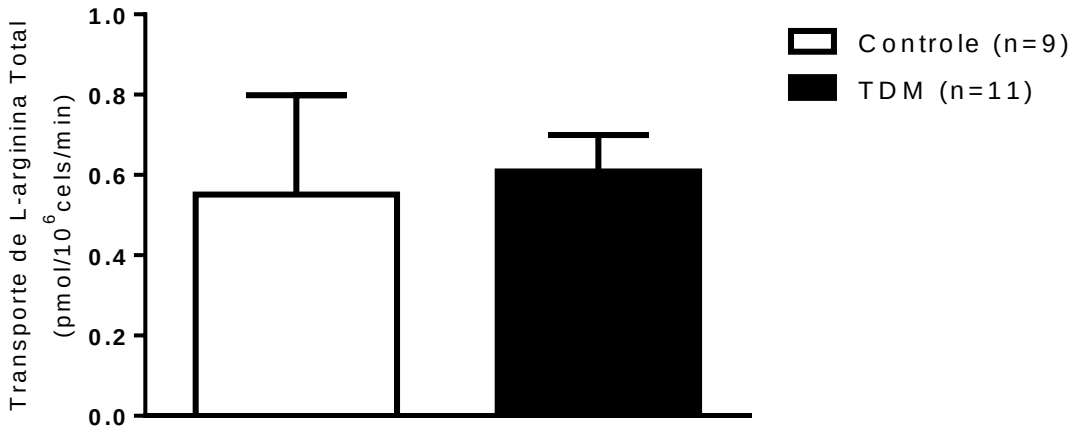
4.4 **Neutrófilos**

4.4.1 Influxo de L-arginina

O transporte de L-arginina total em neutrófilos mostrou-se similar entre pacientes com TDM (0,60 ± 0,09 pmol/10^6céls/min) e controles (0,55 ± 0,08 pmol/10^6céls/min) (Gráfico 3). Quando os sistemas y^+ e y^+L foram isolados também não se observou

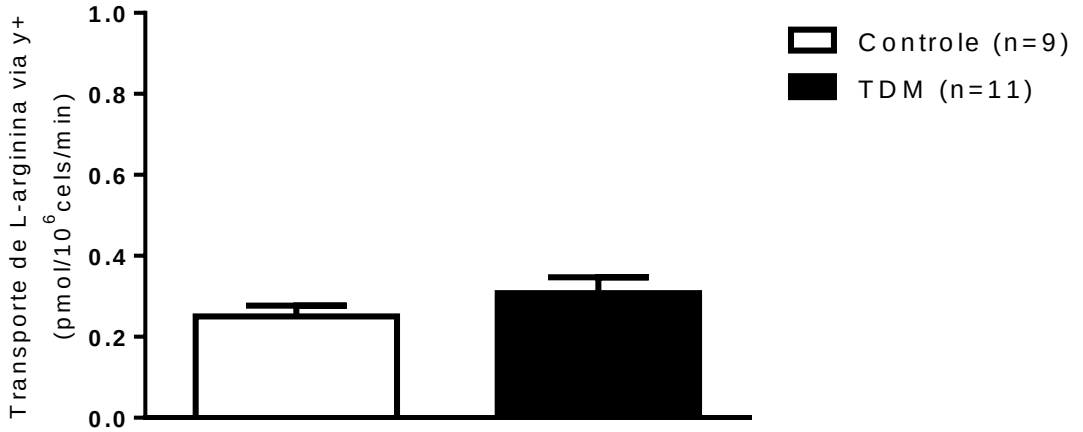
diferença entre os grupos (sistema y^+: TDM = 0,31 ± 0,04 pmol/10^6céls/min; CS= 0,25 ± 0,03 pmol/10^6céls/min, e sistema y^+L: TDM= 0,29 ± 0,05 pmol/10^6céls/min; CS= 0,30 ± 0,06 pmol/10^6céls/min) (Gráficos 4 e 5).

Gráfico 3 – Influxo de L-arginina total em neutrófilos de controles e pacientes TDM.



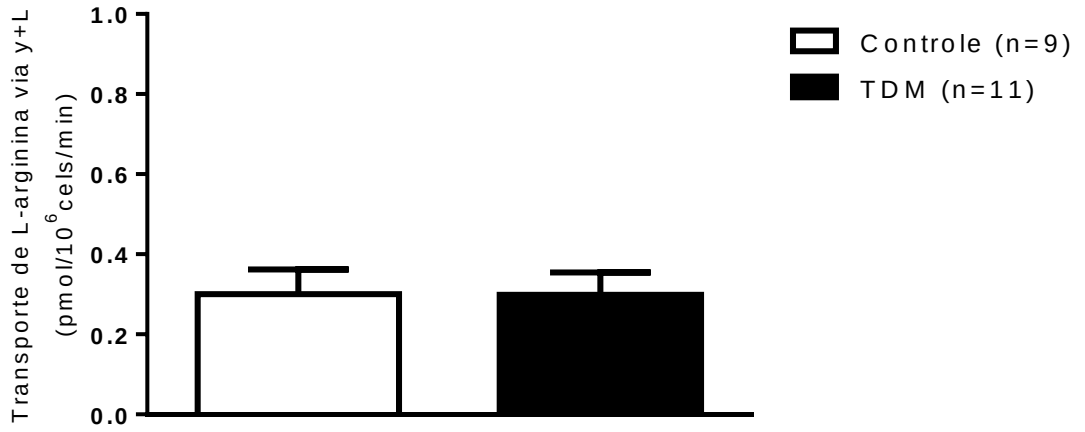
Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

Gráfico 4 – Influxo de L-arginina via sistema y+ em neutrófilos de controles e pacientes TDM.



Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

Gráfico 5 – Influxo de L-arginina via sistema y+L em neutrófilos de controles e pacientes TDM.



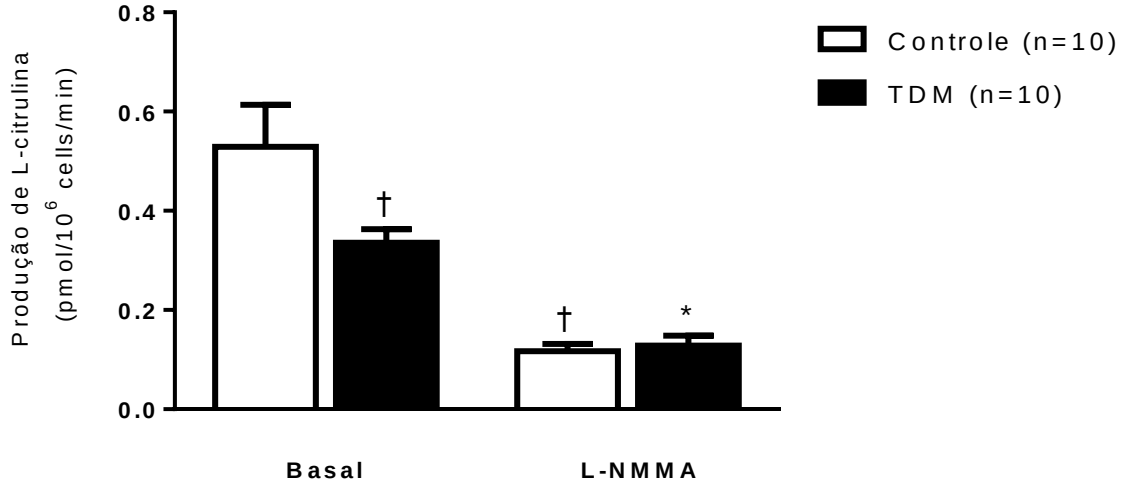
Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

4.4.2 Atividade da enzima óxido nítrico sintase

A atividade basal da NOS apresentou-se significativamente reduzida em neutrófilos de pacientes com TDM (0,34 ± 0,03 pmol/10^6céls/min) comparada aos controles (0,53 ± 0,08 pmol/10^6céls/min) (Gráfico 6).

A presença do análogo da L-arginina, L-NMMA, mostrou-se ser um potente inibidor da atividade basal da NOS de neutrófilos tanto em controles (0,12 ± 0,01 pmol/10^6céls/min) como em pacientes (0,13 ± 0,02 pmol/10^6céls/min).

Gráfico 6 – Produção basal de L[^{3}H]-citrulina em neutrófilos de controles e TDM.

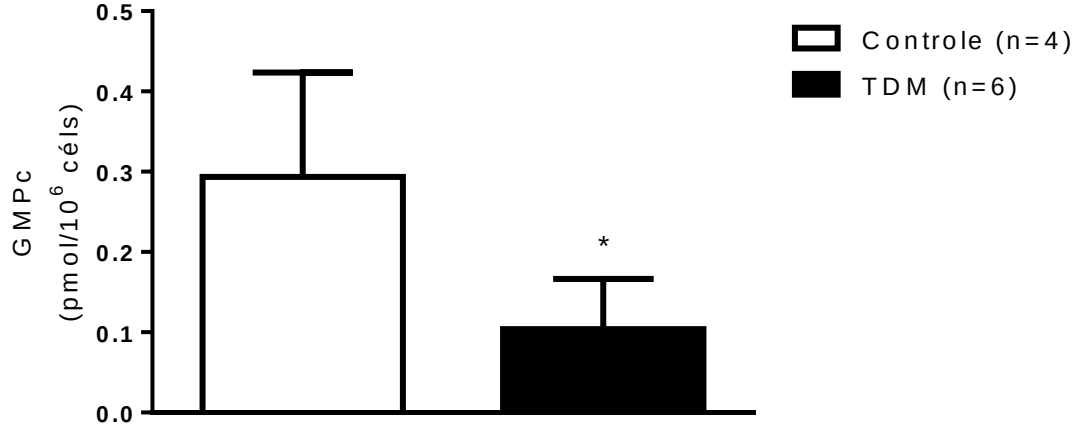


Nota: Os valores estão representados em média ± EPM. † ≠ Controle basal ($P \leq 0,05$); * ≠ TDM basal ($p \leq 0,05$).

4.4.3 GMPc em neutrófilos

Os níveis basais de GMPc em neutrófilos dos pacientes com TDM estavam significativamente diminuídos (0,10 ± 0,03 pmol/10^6 céls) em relação ao grupo controle (0,29 ± 0,08 pmol/10^6 céls) (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Concentração basal de GMPc em neutrófilos de controles e TDM.



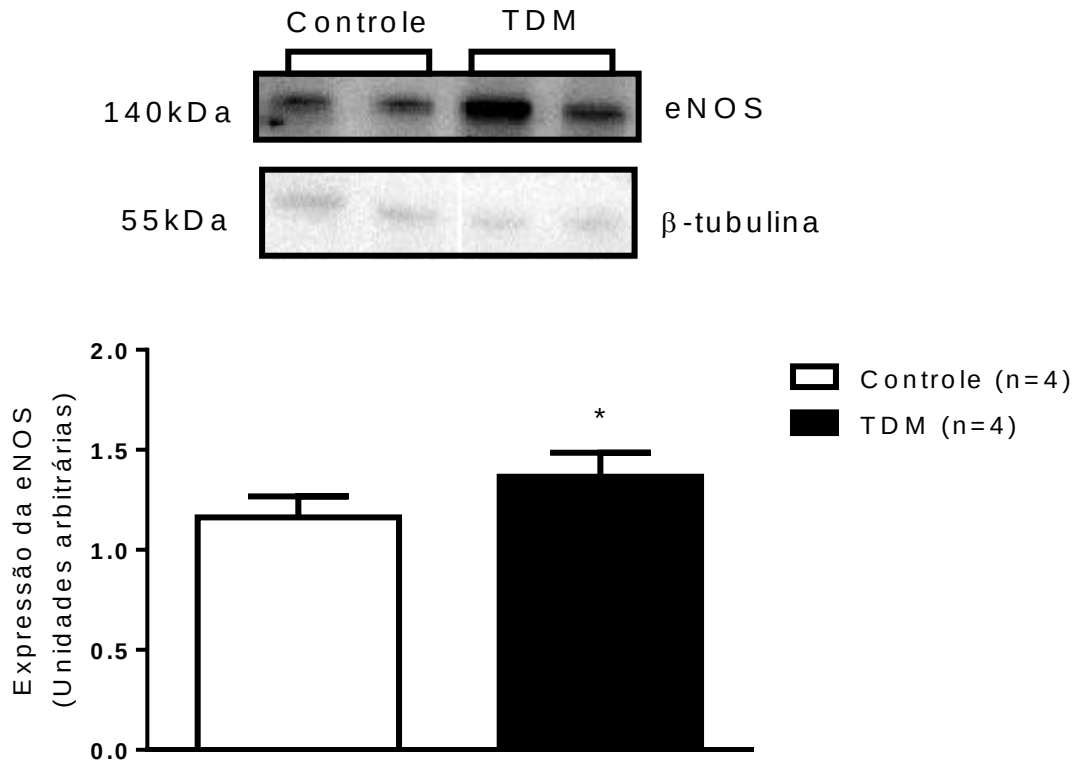
Nota: Os valores estão representados em média ± EPM. * $P \leq 0,05$ vs controle.

4.4.4 Western Blotting em neutrófilos

A avaliação da expressão das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) endotelial e induzível realizada por Western Blotting revela que os neutrófilos humanos expressam eNOS e iNOS (Gráficos 7 e 8).

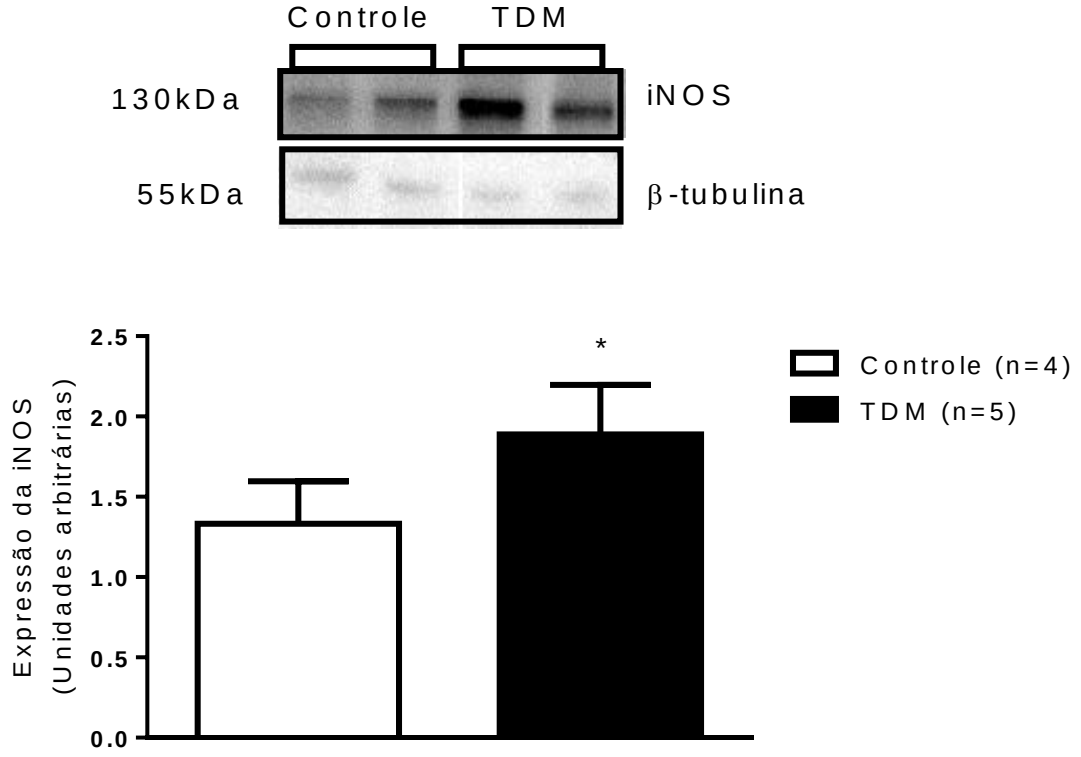
Observou-se um aumento significativo na expressão das isoformas eNOs e iNOS em neutrófilos de pacientes com TDM (eNOS: 1,36 ± 0,06; iNOS: 1,89 ± 0,14 unidades arbitrárias) comparados aos controles (eNOS= 1,16 ± 0,05; iNOS= 1,33 ± 0,13 unidades arbitrárias) (Gráficos 8 e 9).

Gráfico 8 – Expressão da enzima eNOS em neutrófilos de controles e pacientes TDM.



Nota: Os valores estão representados em média ± EPM. * $P \leq 0,05$ vs controle.

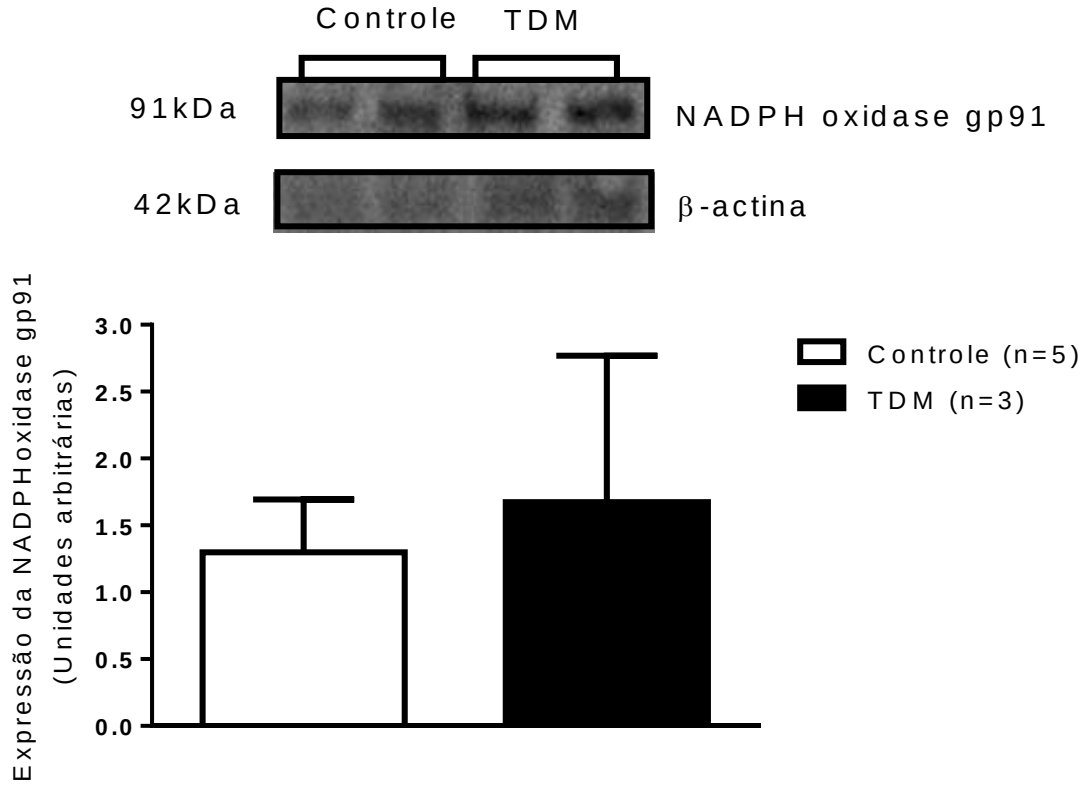
Gráfico 9 – Expressão da enzima iNOS em neutrófilos de controles e pacientes TDM.



Nota: Os valores estão representados em média ± EPM. * $P \leq 0,05$ vs controle

Neutrófilos humanos também expressam a enzima NADPH oxidase gp 91 phox em condições basais. Porém, não houve diferença na expressão da enzima NADPH oxidase gp 91 entre os grupos controle (1,30 ± 0,18 unidades arbitrárias) e TDM (1,67 ± 0,63 unidades arbitrárias) (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Expressão da enzima NADPH oxidase gp91phox em neutrófilos de controles e pacientes TDM.

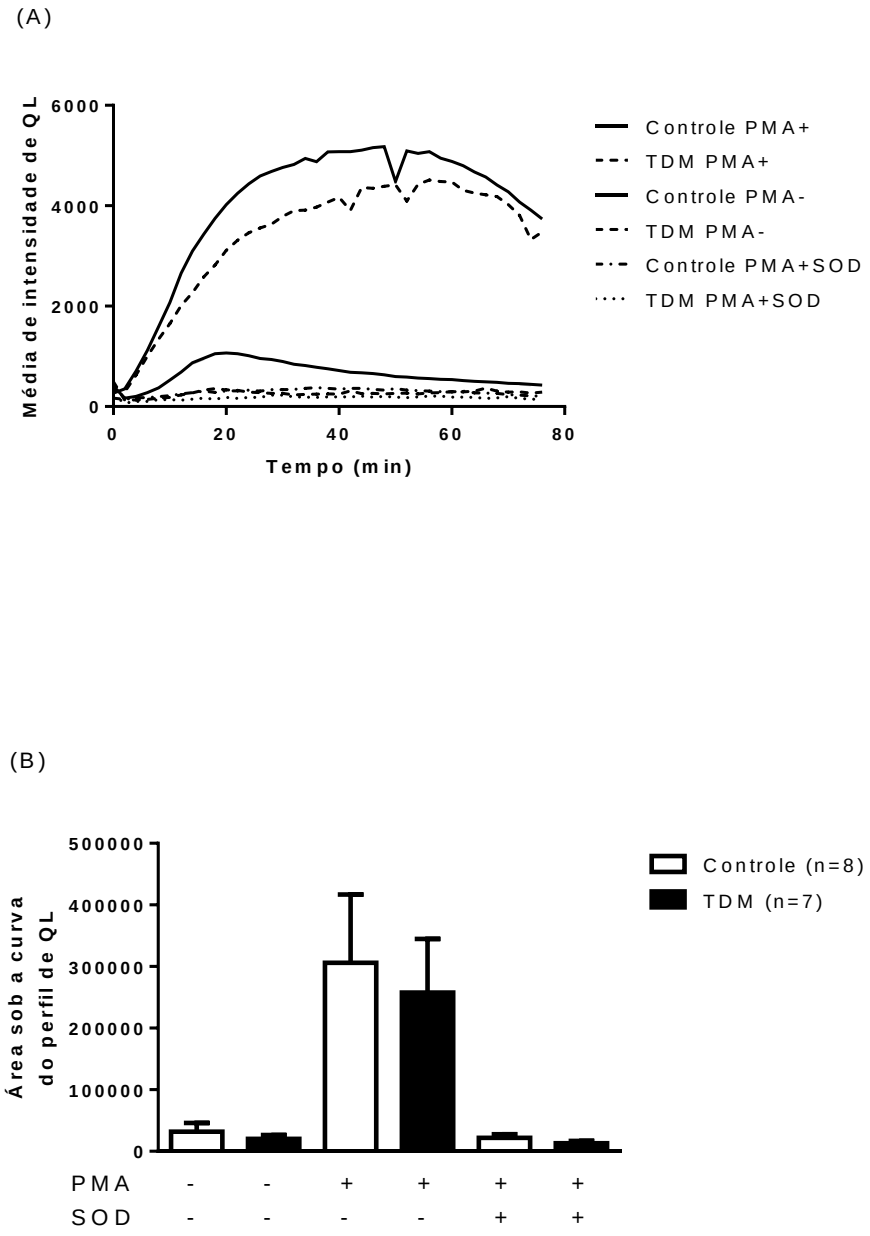


Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

4.4.5 “Burst” oxidativo

Não houve diferença significativa na resposta dos neutrófilos de pacientes com TDM (PMA + = 257791 ± 32872 intensidade QL) comparado ao grupo controle (PMA + = 306156 ± 39180 intensidade QL) quando estimulados com PMA. O mesmo foi verificado quando os neutrófilos foram estimulados na presença de SOD (TDM: PMA + SOD = 13201 ± 2736; CS: PMA + SOD = 22066 ± 3152 intensidade QL) (Gráfico 11 A, B).

Gráfico 11 – Medida do *burst* oxidativo por quimioluminescência (QL) dependente da lucigenina.



Legenda: (A) Média da intensidade de QL em pacientes com TDM e controles estimulados na presença e ausência de superóxido dismutase - SOD (as barras de erro foram suprimidas para melhor visualização). (B) Área sob a curva do perfil de QL sem e com estimulação com PMA, e na presença e ausência de SOD.
Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

4.4.6 Dosagem de aminoácidos

A tabela 4 demonstra a dosagem de aminoácidos em neutrófilos dos controles saudáveis e dos pacientes com TDM. Dentre os aminoácidos abaixo, L-glicina, L-isoleucina, L-leucina e L-valina apresentam-se diminuídos em pacientes TDM.

Tabela 5 – Dosagem de aminoácidos em neutrófilos dos controles saudáveis e dos pacientes com TDM.

Aminoácido, μmol/L	**Controles**	**Pacientes TDM**	***P***
L-arginina	1,76 ± 1,09	0,61 ± 0,28	0,420
L-alanina	13,50 ± 5,52	4,70 ± 3,62	0,219
L-cistina	2,48 ± 0,64	1,75 ± 0,64	0,464
L-glicina	14,50 ± 1,35	3,33 ± 1,47*	0,0005
L-treonina	2,37 ± 0,95	1,90 ± 0,50	0,678
L-isoleucina	14,67 ± 4,79	2,36 ± 0,94*	0,031
L-leucina	19,77 ± 4,30	3,52 ± 1,33*	0,011
L-metionina	5,77 ± 2,62	2,01 ± 0,82	0,139
L-fenilalanina	8,79 ± 2,23	3,02 ± 1,52	0,065
L-valina	16,10 ± 3,99	5,09 ± 1,78*	0,036
L-triptofano	2,57 ± 0,61	3,11 ± 0,69	0,582

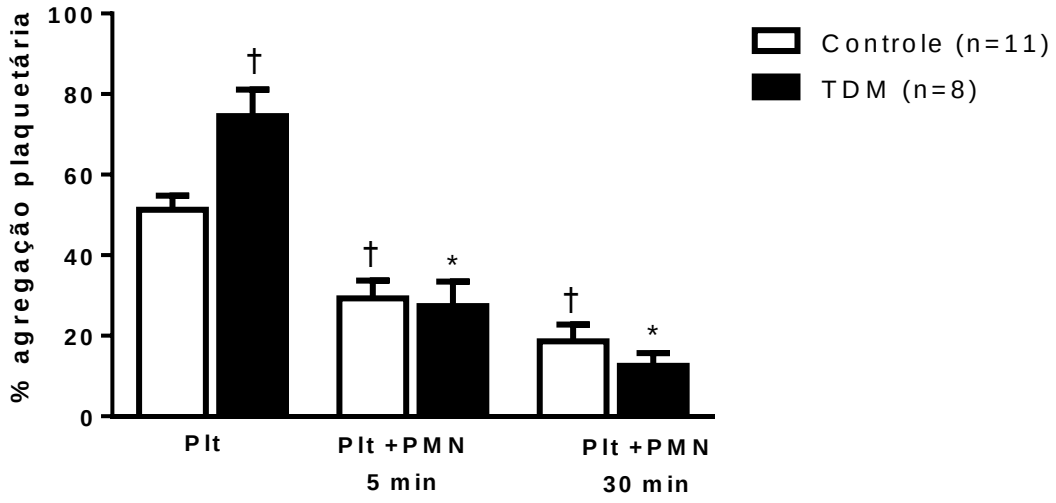
Nota: * $P \leq 0.05$ comparado com controles. (n=3-5). Os valores estão representados em média ± EPM.

4.4.7 Efeitos dos neutrófilos na agregação plaquetária

Houve uma hiperagregabilidade plaquetária em pacientes com TDM (74,50 ± 6,65 % agregação) comparados aos controles (51,27 ± 3,52 % agregação).

Foram observados também efeito tempo-resposta na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP na presença de neutrófilos em controles (5 min = 29,27 ± 4,46; 30 min= 18,64 ± 4,16 % agregação) e pacientes TDM (5 min= 27,38 ± 6,11; 30 min= 12,50 ± 3,19 % agregação), no entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quando incubados com neutrófilos (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Agregação plaquetária induzida por ADP na presença de neutrófilos.



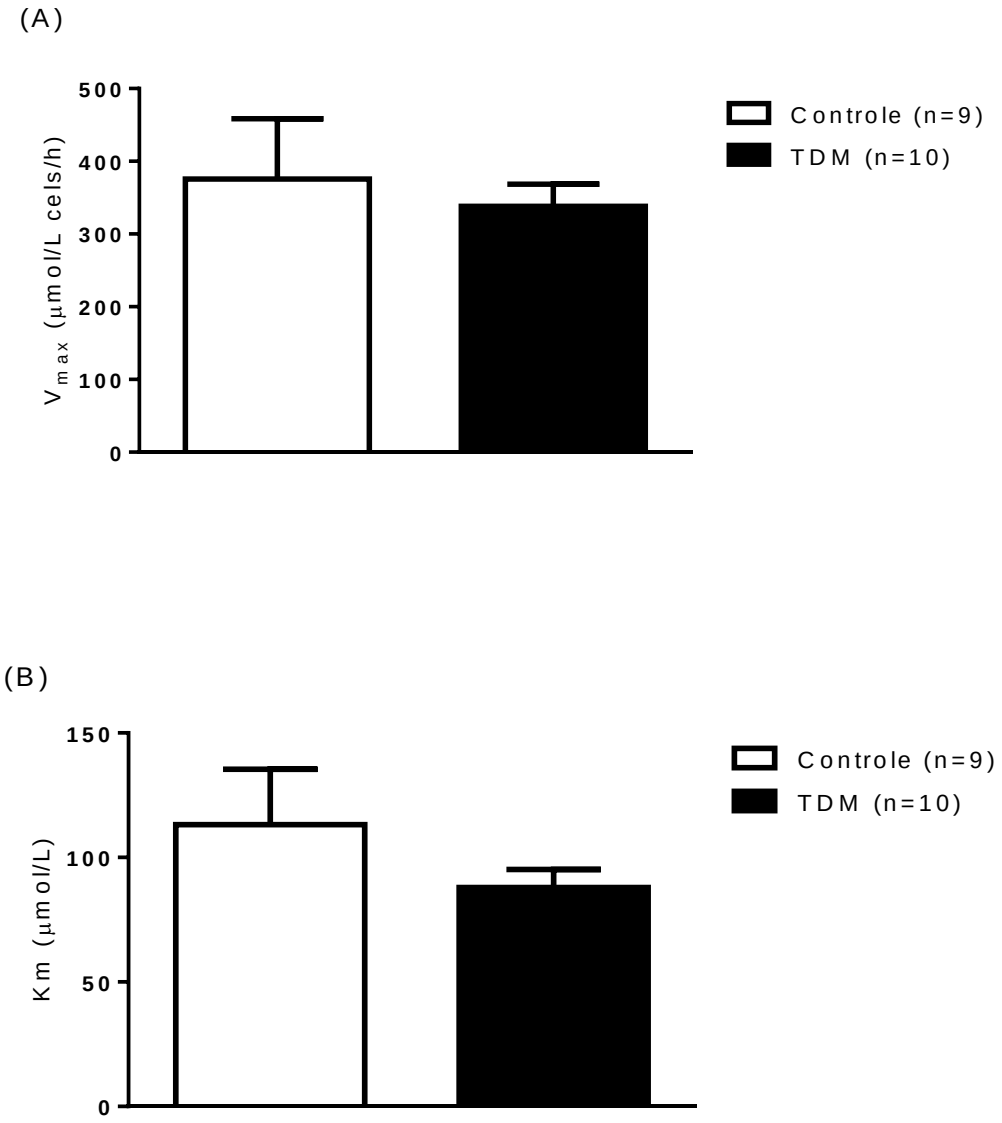
Nota: os valores estão representados em média ± EPM. † ≠ Plt Controle ($P \leq 0,05$); * ≠ Plt TDM ($P \leq 0,05$).

4.5 **Eritrócitos**

4.5.1 Influxo de L-arginina

Não foi detectada diferença significativa do transporte total de L-arginina e nem da afinidade (K_m) nos eritrócitos de pacientes com TDM ($V_{máx}$ = 338,2 ± 30,24 µmol/L céls/h; K_m = 87,97 ± 7,25 µmol/L) e controles ($V_{máx}$ = 375,6 ± 82,88 µmol/L céls/h; K_m = 113,2 ± 22,23 µmol/L) (Gráfico 13 A, B).

Gráfico 13 – Influxo total de L-arginina (A) e K_m (B) em eritrócitos de controles e pacientes TDM.

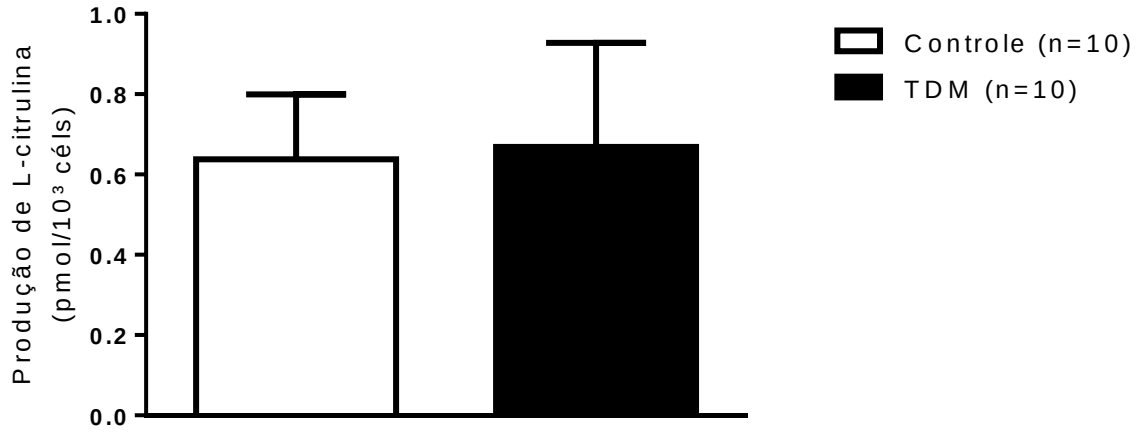


Legenda: (A) $V_{máx}$ = velocidade máxima do fluxo; (B) K_m = concentração do substrato que corresponde à metade do $V_{máx}$.
Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

4.5.2 Atividade da enzima óxido nítrico sintase

A atividade basal da NOS em eritrócitos, medida através da conversão da L-arginina em L-citrulina, não apresentou diferença significativa em pacientes com TDM (0,67 ± 0,08 pmol/10^3céls) comparados aos controles (0,64 ± 0,05 pmol/10^3céls) (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Produção basal de L[^{3}H]-citrulina em eritrócitos de pacientes TDM e controles.

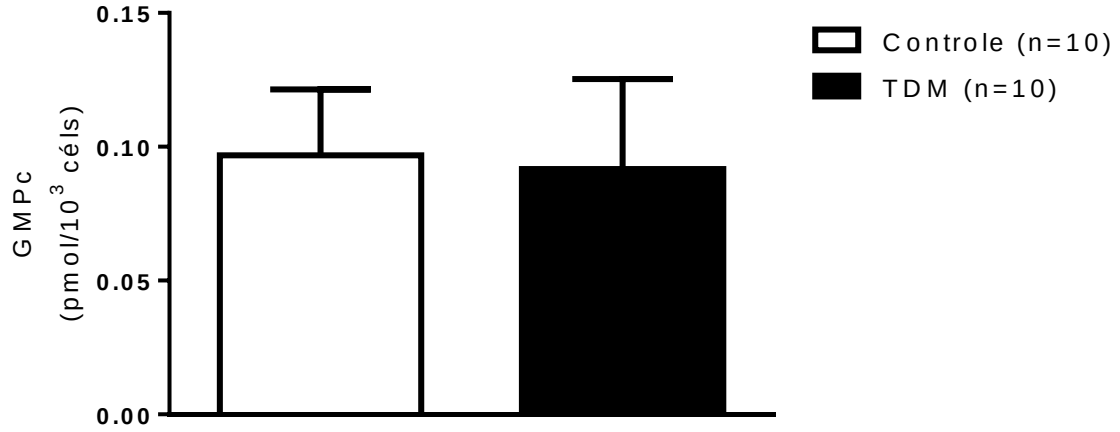


Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

4.5.3 GMPc em eritrócitos

Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis basais de GMPc em eritrócitos dos pacientes com TDM (0,09 ± 0,01 pmol/10^3 céls) e grupo controle (0,10 ± 0,01 pmol/10^3 céls) (Gráfico 15).

Gráfico 15 – Concentrações basais de GMPc em eritrócitos de controles e pacientes com TDM.

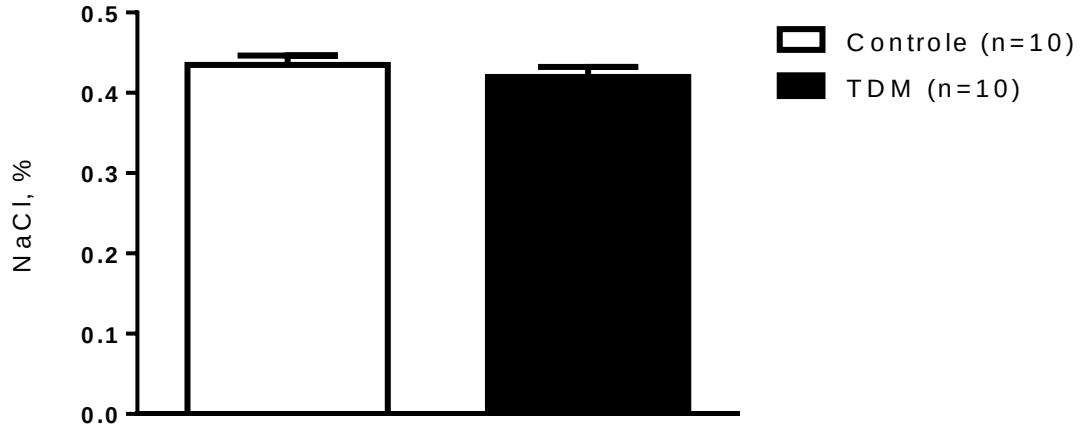


Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

4.5.4 Fragilidade osmótica

Foram realizadas curvas de fragilidade osmótica em eritrócitos de controles e de pacientes com TDM. Em relação ao IC50 (%) entre pacientes (0,42 ± 0,01) e controles (0,43 ± 0,01), não houve diferença significativa (Gráficos 16).

Gráfico 16 – IC50 da fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes com TDM e controles.



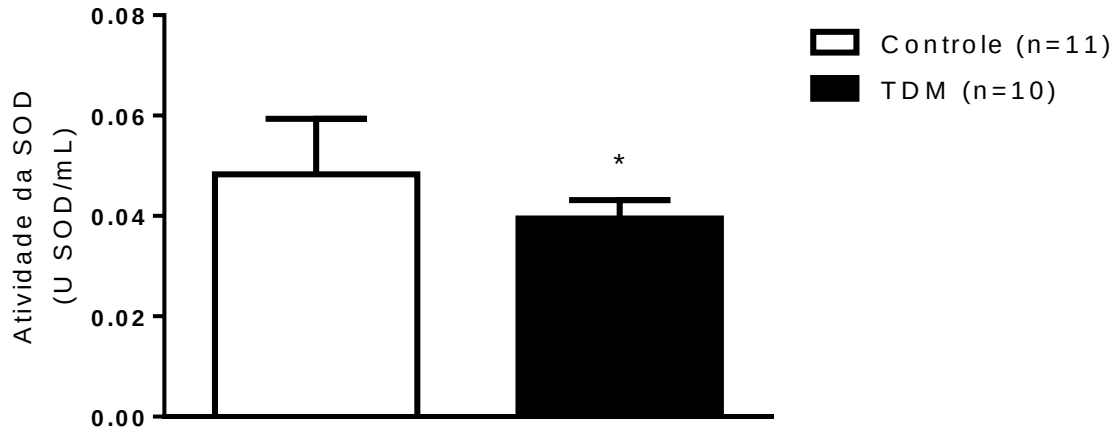
Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

4.5.5 Estresse oxidativo

4.5.5.1 Atividade da SOD

A atividade eritrocitária da enzima antioxidante SOD apresentou-se diminuída em pacientes TDM (0,039 ± 0,001 U/mL) comparados aos controles (0,048 ± 0,003 U/mL) (Gráfico 17).

Gráfico 17 – Atividade da SOD em eritrócitos de controles e pacientes TDM.

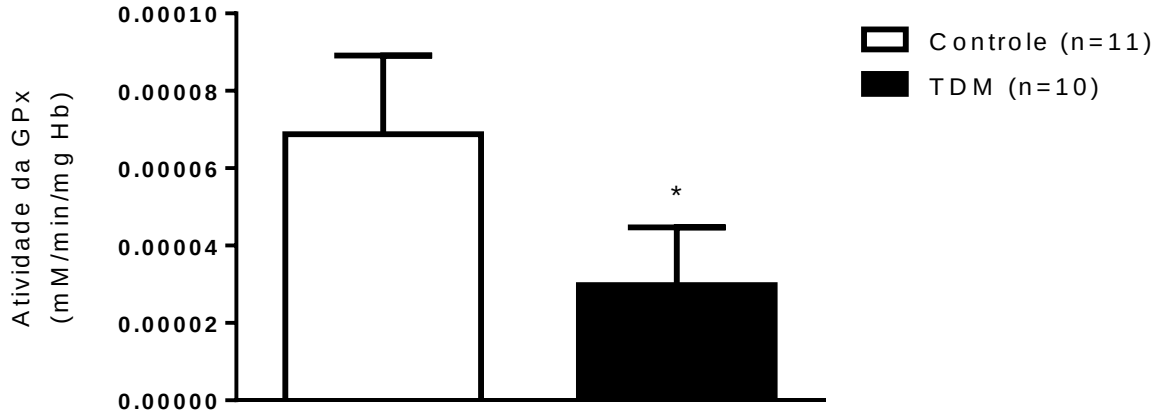


Nota: Os valores estão representados em média ± EPM. * *P* ≤ 0,05 vs controle.

4.5.5.2 Atividade da GPx

Houve diminuição na atividade enzimática da GPx presente no grupo de pacientes com TDM (2,980e-005 ± 4,721e-006 mM/min/mg Hb) em relação aos controles (6,882e-005 ± 6,132e-006 mM/min/mg Hb) (Gráfico 18).

Gráfico 18 – Atividade da GPx em eritrócitos de controles e pacientes TDM.

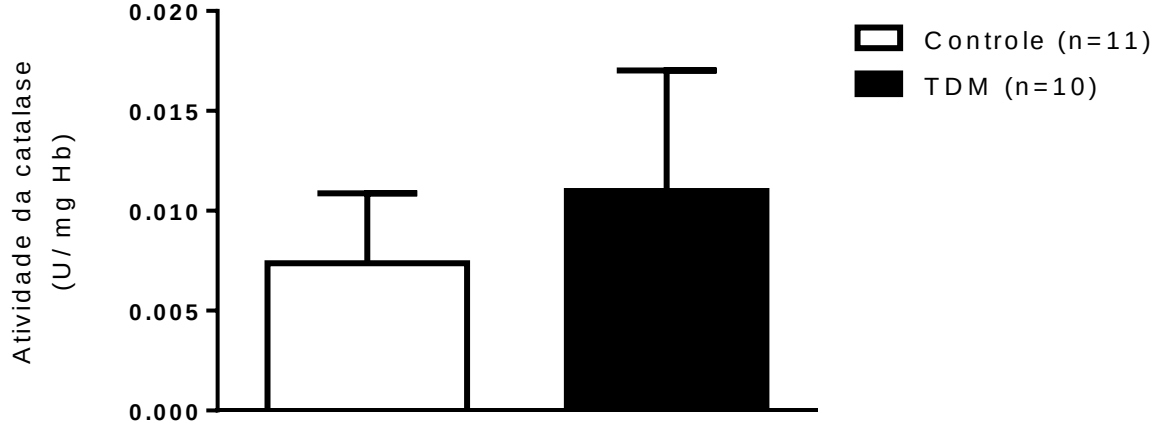


Nota: Os valores estão representados em média ± EPM. * *P* ≤ 0,05 vs controle.

4.5.5.3 Atividade da Catalase

Não foi encontrada diferença significativa entre os pacientes com TDM (0,011 ± 0,002 U/mg Hb) e os controles (0,007 ± 0,001 U/mg Hb) quanto à atividade da enzima antioxidante catalase em eritrócitos (Gráfico 19).

Gráfico 19 – Atividade da catalase em eritrócitos de controles e pacientes TDM.

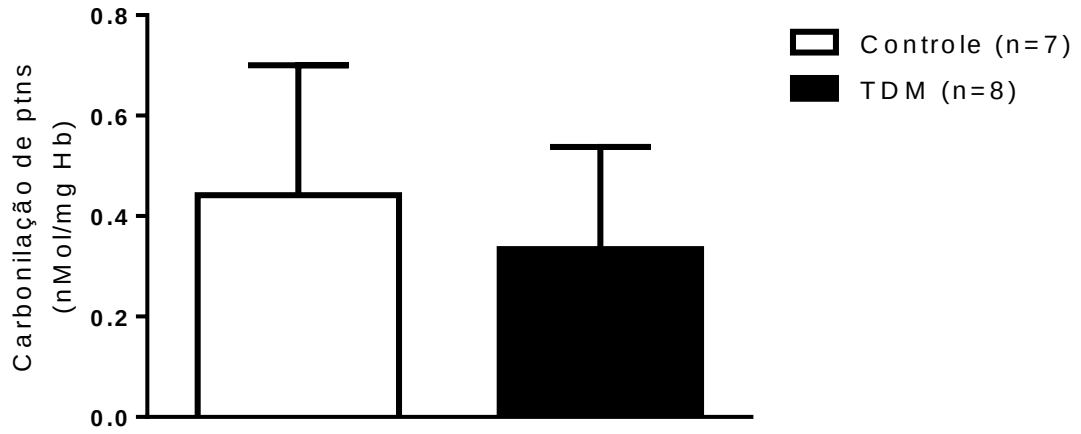


Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

4.5.5.4 Carbonilação de proteínas

Não foi observada diferença significativa na carbonilação de proteínas entre os grupos controle (0,44 ± 0,10 nMol/mg Hb) e TDM (0,33 ± 0,07 nMol/mg Hb) em eritrócitos (Gráfico 20).

Gráfico 20 – Carbonilação de proteínas em eritrócitos de controles e pacientes com TDM.



Nota: Os valores estão representados em média ± EPM.

5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou pela primeira vez que os pacientes com TDM sem qualquer outra comorbidade apresentaram níveis reduzidos de NO em neutrófilos. Anteriormente, nosso grupo relatou esses baixos níveis de NO em plaquetas [9, 11] e células endoteliais vasculares [178] de pacientes com TDM, e como consequência, houve aumento na agregação plaquetária e na disfunção endotelial, que predispõem a eventos aterotrombótico. Estes eventos, por sua vez, são uma das principais causas de morbidade e mortalidade no TDM [179].

O presente estudo investigou algumas das etapas envolvidas na via L-arginina-NO, tanto em neutrófilos quanto em eritrócitos de pacientes com TDM. A síntese de NO depende do influxo do seu precursor, o aminoácido L-arginina, que é mediado pelos sistemas de transporte catiônicos y^+ e y^+L [180] presentes em ambos os elementos figurados do sangue analisados. O que não foi um fator limitante neste estudo, uma vez que não foi observada qualquer diferença entre o grupo TDM e controle sobre o influxo de L-arginina tanto em neutrófilos quanto em eritrócitos.

Níveis adequados de L-arginina, no entanto, podem ser afetados por outros fatores. Selley et al. (2004) demonstraram que os pacientes depressivos apresentam aumento nos níveis plasmáticos de ADMA, que é um análogo da L-arginina endógena e, como tal, pode competitivamente inibir o seu influxo e a consequente ativação da óxido nítrico sintase (NOS) [148]. No presente estudo, foi testado o efeito de outro análogo, o L-NMMA, na atividade basal das NOS em neutrófilos e este mostrou ser um potente inibidor destas enzimas.

O NO é uma molécula sintetizada pela família de enzimas NOS, constituída por suas 3 isoformas: I ou neuronal (nNOS), II ou induzível (iNOS) e III ou endotelial (eNOS), todas presentes em neutrófilos [181] enquanto em eritrócitos destaca-se a eNOS [182]. A atividade da NOS igualmente depende de níveis adequados de co-fatores para produzir NO, particularmente é indispensável a BH_4, a qual está diminuída no plasma de pacientes com depressão [183]. Na falta destes, a NOS é tida como desacoplada, e a transferência de elétrons entre os dois domínios da enzima é prejudicada levando à produção de ânion superóxido, ao invés de NO. O desacoplamento da NOS está sendo intensamente investigado por seu papel na patogênese, bem como um possível alvo terapêutico nas doenças cardiovasculares [184]. No entanto, uma melhor compreensão desses fatores para além da

diminuição da produção de NO requer uma investigação mais aprofundada em elementos figurados do sangue.

Além disso, a L-arginina é um substrato para a atividade de outras enzimas, especialmente a arginase, levando à geração de L-ornitina e ureia [66]. Como existe uma complexa interação entre a expressão e atividade da NOS e arginase de modo que o produto de uma pode inibir a atividade da outra, a enzima arginase estaria desviando a L-arginina para o ciclo da ureia. Foi demonstrado em outro estudo que a atividade da arginase nas células endoteliais é aumentada pelas citocinas inflamatórias [185]. Há evidências de que os níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-6, e TNF-α estão elevados no TDM [186], mas não se sabe se a atividade da arginase em neutrófilos e eritrócitos estaria afetada. Para isso, futuros estudos da atividade e expressão da arginase em pacientes com TDM são necessários.

Uma vez sintetizado, o NO exerce suas ações por meio da ativação de GCs, geração de GMPc, e ativação da proteína G quinase e proteínas específicas [187]. Dessa forma, confirmando os baixos níveis de NO, neste estudo, também foram encontrados níveis reduzidos de GMPc em neutrófilos de pacientes TDM. Apesar de não terem sido observadas diferenças entre os grupos no que diz respeito aos seus eritrócitos.

Por outro lado, houve um significativo aumento da expressão de eNOS e iNOS nos neutrófilos de pacientes TDM quando comparados com controles. Este pode ser considerado um mecanismo compensatório para uma atividade diminuída da NOS. Porém, o aumento da expressão da NOS só resulta em síntese se níveis adequados de substrato e cofatores estiverem disponíveis. Do contrário, o ânion-superóxido é formado, e a enzima NOS pode se tornar uma fonte de estresse oxidativo [188]. Níveis excessivos de EROs, incluindo radicais superóxido e hidroxila, podem danificar os componentes celulares e induzir a anormalidades funcionais em muitos tipos de células [189].

Mesmo que os neutrófilos não sejam classicamente responsáveis pela manutenção de homeostase vascular, um crescente volume de evidências tem mostrado que a interação entre plaquetas e leucócitos (lembrando que os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes) é um processo central na patogênese e progressão da aterosclerose e trombose [190, 191]. Neste caso, os níveis reduzidos de NO em neutrófilos podem impedir a inibição de β2-integrinas [20], o que pode

levar ao aumento da ativação de neutrófilos e às potenciais interações prejudiciais com o endotélio e as plaquetas.

Neste estudo, os pacientes TDM apresentaram uma hiperagregabilidade das plaquetas, confirmando achados anteriores [11]. Porém, houve uma redução tempo-dependente quando as plaquetas foram incubadas por 5 e 30 min com neutrófilos autólogos tanto em pacientes com TDM como em controles, mas sem diferença significativa entre os grupos. Isto reforça a interação bioquímica entre plaquetas e neutrófilos e sugere que, embora a biodisponibilidade esteja reduzida, neutrófilos de pacientes TDM ainda são capazes de sintetizar NO em quantidades capazes de inibir a agregação de plaquetas, pelo menos *in vitro* e em pacientes que apresentem depressão leve a moderada.

Outro fator fundamental em relação ao NO, é que quando produzido nos eritrócitos, também possui a importante função de regular a função plaquetária e de controlar o fluxo sanguíneo [192], além de agir no controle da deformabilidade e fluidez da membrana eritrocitária e sua reologia [193, 194].

Em um contexto onde a disponibilidade de NO está diminuída, como ocorre no TDM, é possível que haja um agravamento da fragilidade da membrana plasmática de eritrócitos. Estudos mostram a presença de dano oxidativo na membrana eritrocitária de pacientes depressivos [149], que desencadearia o estresse oxidativo fazendo com que a membrana de eritrócitos se torne mais rígida, menos resistente e apresentem uma maior fragilidade osmótica [195]. Apesar de, no estudo atual, não ter sido observado nenhuma diferença na fragilidade osmótica, ou na carbonilação de proteínas e na atividade da enzima antioxidante catalase dos eritrócitos entre os grupos, pudemos verificar uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx no TDM, o que pode predispor a um dano celular devido ao desequilíbrio entre estas e os agentes pró-oxidantes [196].

Os baixos níveis de NO nos neutrófilos também podem levar a um aumento da produção das EROs [93], porém, aqui não houve qualquer diferença tanto na expressão da enzima NADPH oxidase subunidade gp91phox quanto no “burst” oxidativo entre os grupos TDM e saudável. Embora tenhamos focado nas implicações vasculares de NO derivado dos neutrófilos, não podemos esquecer o seu papel essencial na função básica destas células. O NO afeta a quimiotaxia de neutrófilos, morte microbiana e apoptose [17]. Por esta razão, podemos supor que o

NO pode estar envolvido com a baixa imunidade presente no TDM, mas reconhecemos que isso merece uma melhor investigação.

Como mencionado anteriormente, a atividade da NOS depende de níveis adequados de L-arginina intracelular. Nesta ocasião, os níveis do aminoácido L-arginina, comparados entre pacientes com TDM e controles saudáveis, foram semelhantes em neutrófilos. Assim, pode-se considerar que não seja o fator limitante para a atividade da enzima NOS. Por outro lado, os níveis mais baixos dos aminoácidos glicina, isoleucina, leucina e valina foram observados em neutrófilos dos pacientes depressivos. Vale destacar que este é o primeiro estudo que mediu as concentrações de aminoácidos em neutrófilos. Alguns outros estudos relataram apenas a alteração dos níveis sistêmicos de alguns aminoácidos no TDM. Os níveis sistêmicos de glutamato, taurina e lisina estão aumentados em pacientes depressivos [197, 198], e os níveis plasmáticos de glutamato, alanina e L-serina podem refletir a gravidade da depressão [199]. No entanto, estes podem não refletir o estado intracelular.

A glicina é considerada um "inibidor" de aminoácidos, uma vez que abre canais de cloreto e hiperpolariza membranas por ligação aos receptores de glicina que estão presentes em muitas células, incluindo os neutrófilos [200]. Além disso, ela parece exercer vários efeitos protetores, a redução da inflamação, a ativação do sistema imune, a produção das citocinas e a inibição da agregação plaquetária. A glicina atua sobre as células inflamatórias tais como os macrófagos para suprimir a ativação de fatores de transcrição e a formação de radicais livres e citocinas inflamatórias [200, 201]. Portanto, os baixos níveis de glicina em neutrófilos podem estar envolvidos na diminuição da imunidade observada no TDM.

Aqui, observou-se também em neutrófilos os níveis reduzidos de todos os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), leucina, isoleucina e valina, que são importantes para a função fagocítica de neutrófilos [202]. Logo, níveis de BCAAs reduzidos podem levar a respostas imunológicas inatas inadequadas.

Um achado secundário do nosso estudo foi a alteração das variáveis hematológicas em pacientes depressivos, embora estivessem dentro dos parâmetros de normalidade. Observaram-se no TDM os níveis mais baixos de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina, achado que parece ser consistente em TDM [203, 204]. Estudos realizados pelo grupo de Michael Maes no final dos anos 90 sugeriram que as mudanças na série vermelha do sangue estão relacionadas com a

ativação do sistema de resposta inflamatória mediada por citocinas pró-inflamatórias [204], o que reflete as respostas somáticas complexas desencadeadas por fatores psicológicos. A segunda variável hematológica alterada foi a contagem de plaquetas, que foi significativamente maior em pacientes com TDM em comparação com indivíduos saudáveis. Lee et al. [205] também relataram aumento da contagem de plaquetas em pacientes com TDM não-suicidas, o que seria um achado incidental, sem implicações clínicas, pois a maioria dos estudos [50, 206, 207] mostram que a contagem de plaquetas não difere entre indivíduos depressivos e não-depressivos. No entanto, estudos têm mostrado que o aumento da contagem de plaquetas, mesmo dentro da faixa normal, contribui para o aumento do risco de acidente vascular cerebral em pacientes com estenose carotídea sintomática [208] e está associada ao aumento da mortalidade cardiovascular em pacientes com doença renal em fase terminal [209]. Portanto, se este foi um achado incidental ou pode ter implicações clínicas e ser associado com o aumento do risco cardiovascular em TDM, deve ser abordado em futuros estudos longitudinais envolvendo maior número de participantes.

Também encontramos níveis séricos reduzidos de fibrinogênio no TDM. Há consenso na literatura quanto aos níveis sistêmicos de fibrinogênio, sendo relatados aumentados [210, 211], similares ou diminuídos em pacientes com TDM em comparação com não-depressivo [212, 213], mesmo quando diferentes níveis de severidade da depressão foram considerados. Como o fibrinogênio é a principal proteína de coagulação do sangue, esperava-se observar níveis aumentados no TDM. Contudo, os baixos níveis de fibrinogênio podem indicar uma ativação sistêmica do sistema de coagulação, quando o seu consumo ocorre a uma taxa maior do que a sua síntese [214].

Este estudo apresenta algumas limitações, primeiro, por se tratar de um estudo transversal com um pequeno tamanho de amostra, e segundo, por não termos considerado os possíveis efeitos do gênero em nossos resultados, tendo em vista que os pacientes foram recrutados por anúncio colocado no Hospital e na Universidade, e a maioria dos sujeitos que se apresentaram foram mulheres. Embora isso não tenha sido intencional, pode ter refletido o aumento da prevalência de TDM em mulheres. Estudos epidemiológicos demonstraram que o risco ao longo da vida de desenvolver depressão maior é 70% maior nas mulheres do que nos

homens [215] e as mulheres também são mais propensas a procurar ajuda médica [216]. Estudos futuros são necessários para investigar esse importante fator.

CONCLUSÃO

Portanto, a diminuição na biodisponibilidade do NO e dos níveis de GMPc, além de níveis reduzidos de BCAAs e L-glicina em neutrófilos, podem contribuir para a disfunção do sistema imunológico e interações de neutrófilos com outras células, incluindo as plaquetas, células endoteliais vasculares e, até mesmo, com os eritrócitos. Em consequência ao baixo nível de NO nos neutrófilos, e as defesas antioxidantes diminuídas nos eritrócitos poderia haver um aumento do estresse oxidativo no TDM. Uma melhor compreensão da baixa biodisponibilidade de NO na função fagocítica de neutrófilos, assim como sua associação com outras células ou tecidos, ajudaria a esclarecer a disfunção do sistema imune e o aumento da morbidade cardiovascular no TDM.

REFERÊNCIAS

1. Lepine, J.P., Briley, M. *The increasing burden of depression.* Neuropsychiatr Dis Treat, 2011. **7**(Suppl 1): p. 3-7.

2. OMS. *Depression: A Global Crisis World Mental Health Day.* 2012.

3. Carney, R.M. et al. *History of depression and survival after acute myocardial infarction.* Psychosom Med, 2009. **71**(3): p. 253-9.

4. Goldstein, M.M. *Depression-An independent risk factor for cardiovascular disease.* JAAPA, 2006. **19**(9): p. 40-2, 44, 46.

5. Arslan, A., Uzun, M. *Does the lower nitric oxide level cause cardiovascular changes in major depressed women?* Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2008. **12**(5): p. 309-13.

6. Swaab, D.F., Bao, A.M., Lucassen, P.J. *The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration.* Ageing Res Rev, 2005. **4**(2): p. 141-94.

7. Dougherty, J.H., Levy, D.E., Weksler, B.B. *Platelet activation in acute cerebral ischaemia. Serial measurements of platelet function in cerebrovascular disease.* Lancet, 1977. **1**(8016): p. 821-4.

8. Glassman, A. *Depression and cardiovascular disease.* Pharmacopsychiatry, 2008. **41**(6): p. 221-5.

9. Pinto, V.L., et al. *Low plasma levels of l-arginine, impaired intraplatelet nitric oxide and platelet hyperaggregability: Implications for cardiovascular disease in depressive patients.* J Affect Disord, 2012. **140**(2):187-92

10. Chrapko, W.E., et al. *Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder.* Biol Psychiatry, 2004. **56**(2): p. 129-34.

11. Ormonde do Carmo, M.B., et al. *Major depression induces oxidative stress and platelet hyperaggregability.* J Psychiatr Res, 2015. **61**: p. 19-24.

12. Maes, M., et al. *Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness.* J Affect Disord, 2000. **58**(3): p. 241-6.

13. Sarandol, A., et al. *Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems.* Hum Psychopharmacol, 2007. **22**(2): p. 67-73.

14. Garcia, R.G., et al. *Plasma nitrate levels and flow-mediated vasodilation in untreated major depression.* Psychosom Med, 2011. **73**(4): p. 344-9.

15. Brunini, T.M., et al. *Platelet nitric oxide synthesis in uremia and malnutrition: a role for L-arginine supplementation in vascular protection?* Cardiovasc Res, 2007. **73**(2): p. 359-67.

16. Brown, A.D., Barton, D.A., Lambert, G.W. *Cardiovascular abnormalities in patients with major depressive disorder: autonomic mechanisms and implications for treatment.* CNS Drugs, 2009. **23**(7): p. 583-602.

17. Sethi, S., Dikshit, M. *Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide.* Thromb Res, 2000. **100**(3): p. 223-47.

18. Janeway, J.C., et.al. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 5ª ed. 2002, Porto Alegre: Artmed.

19. Raghavan, S.A., Sharma, P., Dikshit, M. *Role of ascorbic acid in the modulation of inhibition of platelet aggregation by polymorphonuclear leukocytes.* Thromb Res, 2003. **110**(2-3): p. 117-26.

20. Bhopale, V.M., et al. *Factors Associated with Nitric Oxide-mediated beta2 Integrin Inhibition of Neutrophils.* J Biol Chem, 2015. **290**(28): p. 17474-84.

21. Della Bona, R., et al. *Polymorphonuclear neutrophils and instability of the atherosclerotic plaque: a causative role?* Inflamm Res, 2013. **62**(6): p. 537-50.

22. Tsuda, K., et al. *Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: An electron paramagnetic resonance investigation.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(3): p. 946-54.

23. Bor-Kucukatay, M., et al. *Effects of nitric oxide on red blood cell deformability.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(5): p. H1577-84.

24. Pawloski, J.R., Swaminathan, R.V., Stamler, J.S. *Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation.* Circulation, 1998. **97**(3): p. 263-7.

25. Chen, L.Y. Mehta, J.L. *Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function.* J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **32**(1): p. 57-61.

26. Singh, A.K., et al. *High oxidative stress adversely affects NFkappaB mediated induction of inducible nitric oxide synthase in human neutrophils: Implications in chronic myeloid leukemia.* Nitric Oxide, 2016. **58**: p. 28-41.

27. Clancy, R.M., Leszczynska-Piziak, J., Abramson, S.B. *Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase.* J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1116-21.

28. Babior, B.M., Lambeth, J.D., Nauseef, W. *The neutrophil NADPH oxidase.* Arch Biochem Biophys, 2002. **397**(2): p. 342-4.

29. Rybka, J., et al. *Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression.* Free Radic Biol Med, 2013. **63**: p. 187-94.

30. Dowlati, Y., et al. *A meta-analysis of cytokines in major depression.* Biol Psychiatry, 2010. **67**(5): p. 446-57.

31. Fagundes, C.P., et al. *Depressive symptoms enhance stress-induced inflammatory responses.* Brain Behav Immun, 2013. **31**: p. 172-6.

32. Solomon, A. *O demônio do meio-dia: uma anatomia da depressão.* 2014: Companhia das letras.

33. Kandel, E. *Distúrbios do humor: depressão, mania e distúrbios de ansiedade. Princípios de Neurociência*. 2002, Editora Manole. p. 1210-1225.

34. Peres, U.T. *Depressão e melancolia*. 2003, Jorge Zahar.

35. Pessoti, I. *O século dos manicômios*. 1996, Editora 34.

36. Rodrigues, M.J.S.F. *O diagnóstico de depressão.* Psicol. USP, 2000. **11**: p. 155-187.

37. Amen, D.G. *Transforme seu cérebro, transforme sua vida*. 2000, Mercuryo.

38. Association, A.P. *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais e de Comportamento (DSM-IV)*. 4ª edição ed. 2000, Artes Médicas.

39. Hasin, D.S., et al. *Epidemiology of major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions.* Arch Gen Psychiatry, 2005. **62**(10): p. 1097-106.

40. Ramsey, J.M., et al. *Sex Differences in Serum Markers of Major Depressive Disorder in the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA).* PLoS One, 2016. **11**(5): e0156624.

41. Grau-Lopez, L., et al. *Risk factors for temporary work disability.* Actas Esp Psiquiatr, 2016. **44**(4): p. 119-24.

42. Vaccarino, V., et al. *Depression, inflammation, and incident cardiovascular disease in women with suspected coronary ischemia: the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored WISE study.* J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(21): p. 2044-50.

43. Kessler, R.C., et al. *The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R).* JAMA, 2003. **289**(23): p. 3095-105.

44. Sher, Y., Lolak, S., Maldonado, J.R. *The impact of depression in heart disease.* Curr Psychiatry Rep, 2010. **12**(3): p. 255-64.

45. O'Connor C, M., Gurbel, P.A., Serebruany, V.L. *Depression and ischemic heart disease.* Am Heart J, 2000. **140**(4 Suppl): p. 63-9.

46. Rozanski, A., Blumenthal, J.A., Kaplan, J. *Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy.* Circulation, 1999. **99**(16): p. 2192-217.

47. Kitzlerova, E. Anders, M. *The role of some new factors in the pathophysiology of depression and cardiovascular disease: overview of recent research.* Neuro Endocrinol Lett, 2007. **28**(6): p. 832-40.

48. Musselman, D.L., Evans, D.L., Nemeroff, C.B. *The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment.* Arch Gen Psychiatry, 1998. **55**(7): p. 580-92.

49. Coryell, W., Young, E., Carroll, B. *Hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and mortality in major depressive disorder.* Psychiatry Res, 2006. **142**(1): p. 99-104.

50. Musselman, D.L., et al. *Exaggerated platelet reactivity in major depression.* Am J Psychiatry, 1996. **153**(10): p. 1313-7.

51. Carney, R.M., et al. *Depression as a risk factor for cardiac mortality and morbidity: a review of potential mechanisms.* J Psychosom Res, 2002. **53**(4): p. 897-902.

52. Joynt, K.E., Whellan, D.J., O'Connor, C.M. *Depression and cardiovascular disease: mechanisms of interaction.* Biol Psychiatry, 2003. **54**(3): p. 248-61.

53. Miller, G.E., Cohen, S., Herbert, T.B. *Pathways linking major depression and immunity in ambulatory female patients.* Psychosom Med, 1999. **61**(6): p. 850-60.

54. Pinto, V.L., et al. *Depression and cardiovascular disease: role of nitric oxide.* Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2008. **6**(2): p. 142-9.

55. Jancinova, V., et al. *Platelet-dependent modulation of polymorphonuclear leukocyte chemiluminescence.* Platelets, 2000. **11**(5): p. 278-85.

56. Cengel, A., Sahinarslan, A. *Nitric oxide and cardiovascular system.* Anadolu Kardiyol Derg, 2006. **6**(4): p. 364-8.

57. Rajapakse, N.W., Mattson, D.L. *Role of L-arginine in nitric oxide production in health and hypertension.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009. **36**(3): p. 249-55.

58. Moncada, S., Higgs, E.A. *The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology.* Br J Pharmacol, 2006. **147** (1 Suppl): p. S193-201.

59. Hanssen, H., et al. *Increased L-arginine transport in human erythrocytes in chronic heart failure.* Clin Sci (Lond), 1998. **94**(1): p. 43-8.

60. Morris, S.M. Jr. *Enzymes of arginine metabolism.* J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2743S-2747S; discussion 2765S-2767S.

61. Stuehr, D.J. *Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway.* J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S.

62. Reyes, A.A., Karl, I.E., Klahr, S. *Role of arginine in health and in renal disease.* Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 2): p. F331-46.

63. Bustamante, J., Czerniczyniec, A., Lores-Arnaiz, S. *Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function.* Front Biosci, 2007. **12**: p. 1034-40.

64. Palmer, R.M., et al. *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation.* Biochem Biophys Res Commun, 1988. **153**(3): p. 1251-6.

65. Brunini, T.M., et al. *Uremia, atherothrombosis and malnutrition: the role of L-arginine-nitric oxide pathway.* Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006. **6**(2): p. 133-40.

66. Huynh, N.N. Chin-Dusting, J. *Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(1-2): p. 1-8.

67. Tong, B.C. Barbul, A. *Cellular and physiological effects of arginine.* Mini Rev Med Chem, 2004. **4**(8): p. 823-32.

68. Morris, S.M. Jr. *Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis.* Annu Rev Nutr, 1992. **12**: p. 81-101.

69. Elms, S., et al. *Insights into the arginine paradox: evidence against the importance of subcellular location of arginase and eNOS.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(5): p. H651-66.

70. Wang, X., Robinson, P.J. *Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system.* J Neurochem, 1997. **68**(2): p. 443-56.

71. Wong, M.L., et al. *Phosphodiesterase genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant treatment response.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p. 15124-9.

72. Dalack, G.W., Roose, S.P. *Perspectives on the relationship between cardiovascular disease and affective disorder.* J Clin Psychiatry, 1990. **51 (**Suppl): p. 4-9.

73. Maes, M. Twisk, F.N. *Chronic fatigue syndrome: Harvey and Wessely's (bio)psychosocial model versus a bio(psychosocial) model based on inflammatory and oxidative and nitrosative stress pathways.* BMC Med, 2010. **8**: p. 35.

74. Ng, F., et al. *Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications.* Int J Neuropsychopharmacol, 2008. **11**(6): p. 851-76.

75. Galecki, P., et al. *Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment.* Pharmacol Rep, 2009. **61**(3): p. 436-47.

76. Valko, M., et al. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.

77. Halliwell, B.G. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. 2007, Oxford University Press.

78. Droge, W. *Free radicals in the physiological control of cell function.* Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.

79. Beckman, J.S., Koppenol, W.H. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.* Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.

80. Grisham, M.B., Granger, D.N., Lefer, D.J. *Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease.* Free Radic Biol Med, 1998. **25**(4-5): p. 404-33.

81. Lee, G.R.B.; Foerster, J.A., Lukens, J.N. *Leukocytes - The phagocytic and immunologic systems.* 1993: Wintrobe's Clinical Hematology.

82. Silbernagl, S.D.A. *Color atlas of physiology*. 6th ed. 2009, Thieme.

83. Lowe, G.D., et al. *White blood cell count and haematocrit as predictors of coronary recurrence after myocardial infarction.* Thromb Haemost, 1985. **54**(3): p. 700-3.

84. Nieto, F.J., et al. *Leukocyte count correlates in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.* Am J Epidemiol, 1992. **136**(5): p. 525-37.

85. Burg, N.D. Pillinger, M.H. *The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity.* Clin Immunol, 2001. **99**(1): p. 7-17.

86. Witko-Sarsat, V., et al. *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects.* Lab Invest, 2000. **80**(5): p. 617-53.

87. Abbas, A.K.L.A.H., Poder, J.S. *Imunologia Celular e Molecular.* 1995.

88. Kadono, T., et al. *Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4542-50.

89. Kakkar, A.K. Lefer, D.J. *Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice.* Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(2): p. 154-8.

90. Cerqueira N.F.Y.W. *Óxido nítrico. Revisão.* Acta Cir Bras., 2002. **17(6)**: p. 417-42.

91. Rimele, T.J., et al. *Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor.* J Pharmacol Exp Ther, 1988. **245**(1): p. 102-11.

92. Deves, R., Boyd, C.A. *Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function.* Physiol Rev, 1998. **78**(2): p. 487-545.

93. Kumar, S., et al. *Functional and molecular characterization of NOS isoforms in rat neutrophil precursor cells.* Cytometry A, 2010. **77**(5): p. 467-77.

94. Malawista, S.E., Montgomery, R.R. van Blaricom, G. *Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasts. A new microbicidal pathway for polymorphonuclear leukocytes.* J Clin Invest, 1992. **90**(2): p. 631-6.

95. Dikshit, M., Kumari, R., Srimal, R.C. *Pulmonary thromboembolism-induced alterations in nitric oxide release from rat circulating neutrophils.* J Pharmacol Exp Ther, 1993. **265**(3): p. 1369-73.

96. Faint, R.W., Mackie, I.J., Machin, S.J. *Platelet aggregation is inhibited by a nitric oxide-like factor released from human neutrophils in vitro.* Br J Haematol, 1991. **77**(4): p. 539-45.

97. Babior, B.M. *The respiratory burst of phagocytes.* J Clin Invest, 1984. **73**(3): p. 599-601.

98. Meyer, M.R., Barton, M., Prossnitz, E.R. *Functional heterogeneity of NADPH oxidase-mediated contractions to endothelin with vascular aging.* Life Sci, 2014. **118**(2): p. 226-31.

99. El-Benna, J., et al. *Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(3): p. 199-206.

100. Buettner, G.R. *Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide.* Anticancer Agents Med Chem, 2011. **11**(4): p. 341-6.

101. Mocatta, T.J., et al. *Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(20): p. 1993-2000.

102. Cadenas, E. Davies, K.J. *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.* Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 222-30.

103. Dworakowski, R., et al. *Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species.* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 960-4.

104. Maugeri, N., et al. *Platelet-leukocyte deregulated interactions foster sterile inflammation and tissue damage in immune-mediated vessel diseases.* Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 267-73.

105. Libby, P., Simon, D.I. *Inflammation and thrombosis: the clot thickens.* Circulation, 2001. **103**(13): p. 1718-20.

106. Neumann, F.J., et al. *Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets.* Circulation, 1997. **95**(10): p. 2387-94.

107. Ruggeri, Z.M. *Platelets in atherothrombosis.* Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.

108. Arakawa, K., et al. *Significant association between neutrophil aggregation in aspirated thrombus and myocardial damage in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction.* Circ J, 2009. **73**(1): p. 139-44.

109. Cerletti, C., Evangelista, V., De Gaetano, G. *Polymorphonuclear leucocyte-dependent modulation of platelet function: relevance to the pathogenesis of thrombosis.* Pharmacol Res, 1992. **26**(3): p. 261-8.

110. Brown, K.K., et al. *Neutrophil-platelet adhesion: relative roles of platelet P-selectin and neutrophil beta2 (DC18) integrins.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(1): p. 100-10.

111. Dong, H.P., et al. *Lipopolysaccharide-stimulated leukocytes contribute to platelet aggregative dysfunction, which is attenuated by catalase in rats.* Kaohsiung J Med Sci, 2010. **26**(11): p. 584-92.

112. Jyoti, A., et al. *Interaction of inducible nitric oxide synthase with rac2 regulates reactive oxygen and nitrogen species generation in the human neutrophil phagosomes: implication in microbial killing.* Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(3): p. 417-31.

113. White, M.M.J.L.K. *Platelet protocol research and clinical laboratory procedures*. 1999, Academic press.

114. Packham, M.A., Mustard, J.F. *Platelet aggregation and adenosine diphosphate/adenosine triphosphate receptors: a historical perspective.* Semin Thromb Hemost, 2005. **31**(2): p. 129-38.

115. Blockmans, D., Deckmyn, H., Vermylen, J. *Platelet activation.* Blood Rev, 1995. **9**(3): p. 143-56.

116. Saboor, M., et al. *Platelet receptors; an instrumental of platelet physiology.* Pak J Med Sci, 2013. **29**(3): p. 891-896.

117. Mountrakis, L., Lorenz, E., Hoekstra, A.G. *Where do the platelets go? A simulation study of fully resolved blood flow through aneurysmal vessels.* Interface Focus, 2013. **3**(2): p. 20120089.

118. Brunini, T.M., et al. *Increased nitric oxide synthesis in uraemic platelets is dependent on L-arginine transport via system y(+)L.* Pflugers Arch, 2003. **445**(5): p. 547-50.

119. Chen, L.Y., Mehta, J.L. *Variable effects of L-arginine analogs on L-arginine-nitric oxide pathway in human neutrophils and platelets may relate to different nitric oxide synthase isoforms.* J Pharmacol Exp Ther, 1996. **276**(1): p. 253-7.

120. Mehta, J.L., et al. *Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets.* J Lab Clin Med, 1995. **125**(3): p. 370-7.

121. Gkaliagkousi, E., Ritter, J., Ferro, A. *Platelet-derived nitric oxide signaling and regulation.* Circ Res, 2007. **101**(7): p. 654-62.

122. Krotz, F., Sohn, H.Y., Pohl, U. *Reactive oxygen species: players in the platelet game.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(11): p. 1988-96.

123. Ambrose, J.A. *Plaque disruption and the acute coronary syndromes of unstable angina and myocardial infarction: if the substrate is similar, why is the clinical presentation different?* J Am Coll Cardiol, 1992. **19**(7): p. 1653-8.

124. Eligini, S., et al. *Nitric oxide synthetic pathway in red blood cells is impaired in coronary artery disease.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e66945.

125. Verrastro, T. *Hematologia e hemoterapia: fundamentos da morfologia, fisiologia, patologia e clínica*. 2005, Atheneu.

126. Cortese-Krott, M.M., Kelm, M. *Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function?* Redox Biol, 2014. **2**: p. 251-8.

127. Helms, C., Kim-Shapiro, D.B. *Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling.* Free Radic Biol Med, 2013. **61**: p. 464-72.

128. Mendes Ribeiro, A.C., et al. *Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure.* Clin Sci (Lond), 1997. **93**(1): p. 57-64.

129. Moss, M.B., et al. *Diminished L-arginine bioavailability in hypertension.* Clin Sci (Lond), 2004. **107**(4): p. 391-7.

130. Kleinbongard, P., Keymel, S., Kelm, M. *New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood.* Thromb Haemost, 2007. **98**(5): p. 970-4.

131. Moncada, S. *Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology.* Ann N Y Acad Sci, 1997. **811**: p. 60-7; discussion 67-9.

132. Vallance, P., Collier, J., Moncada, S. *Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man.* Lancet, 1989. **2**(8670): p. 997-1000.

133. Rassaf, T., et al. *Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation.* Free Radic Biol Med, 2006. **41**(2): p. 295-301.

134. Winterbourn, C.C. *Oxidative reactions of hemoglobin.* Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 265-72.

135. Rice-Evans, C., Baysal, E. *Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes.* Biochem J, 1987. **244**(1): p. 191-6.

136. Wallace, W.J., Maxwell, J.C., Caughey, W.S. *The mechanisms of hemoglobin autoxidation. Evidence for proton-assisted nucleophilic displacement of superoxide by anions.* Biochem Biophys Res Commun, 1974. **57**(4): p. 1104-10.

137. Winterbourn, C.C., Stern, A. *Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical.* J Clin Invest, 1987. **80**(5): p. 1486-91.

138. Bayer, S.B., et al. *Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation.* FASEB J, 2013. **27**(8): p. 3315-22.

139. Esplugues, J.V. *NO as a signalling molecule in the nervous system.* Br J Pharmacol, 2002. **135**(5): p. 1079-95.

140. Bernstein, H.G., et al. *Nitric oxide synthase-containing neurons in the human hypothalamus: reduced number of immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of depressive patients and schizophrenics.* Neuroscience, 1998. **83**(3): p. 867-75.

141. McLeod, T.M., Lopez-Figueroa, A.L., Lopez-Figueroa, M.O. *Nitric oxide, stress, and depression.* Psychopharmacol Bull, 2001. **35**(1): p. 24-41.

142. Karolewicz, B., et al. *Low nNOS protein in the locus coeruleus in major depression.* J Neurochem, 2004. **91**(5): p. 1057-66.

143. Plotsky, P.M., Owens, M.J., Nemeroff, C.B. *Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis.* Psychiatr Clin North Am, 1998. **21**(2): p. 293-307.

144. Srivastava, N., et al. *A study on nitric oxide, beta-adrenergic receptors and antioxidant status in the polymorphonuclear leukocytes from the patients of depression.* J Affect Disord, 2002. **72**(1): p. 45-52.

145. Pollock, B.G., Laghrissi-Thode, F., Wagner, W.R. *Evaluation of platelet activation in depressed patients with ischemic heart disease after paroxetine or nortriptyline treatment.* J Clin Psychopharmacol, 2000. **20**(2): p. 137-40.

146. Markovitz, J.H., et al. *Platelet activation in depression and effects of sertraline treatment: An open-label study.* Am J Psychiatry, 2000. **157**(6): p. 1006-8.

147. Taddei, S., et al. *Endothelium, aging, and hypertension.* Curr Hypertens Rep, 2006. **8**(1): p. 84-9.

148. Selley, M.L. *Increased (E)-4-hydroxy-2-nonenal and asymmetric dimethylarginine concentrations and decreased nitric oxide concentrations in the plasma of patients with major depression.* J Affect Disord, 2004. **80**(2-3): p. 249-56.

149. Peet, M., et al. *Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients.* Biol Psychiatry, 1998. **43**(5): p. 315-9.

150. Bilici, M., et al. *Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments.* J Affect Disord, 2001. **64**(1): p. 43-51.

151. Khanzode, S.D., et al. *Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors.* Redox Rep, 2003. **8**(6): p. 365-70.

152. Owen, A.J., et al. *Low plasma vitamin E levels in major depression: diet or disease?* Eur J Clin Nutr, 2005. **59**(2): p. 304-6.

153. Young, I.S., Woodside, J.V. *Antioxidants in health and disease.* J Clin Pathol, 2001. **54**(3): p. 176-86.

154. Stefanescu, C. Ciobica, A. *The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression.* J Affect Disord, 2012. **143**(1-3): p. 34-8.

155. Szuster-Ciesielska, A., et al. *Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008. **32**(3): p. 686-94.

156. Cherubini, A., et al. *Potential markers of oxidative stress in stroke.* Free Radic Biol Med, 2005. **39**(7): p. 841-52.

157. Hibbs, J.B., Jr., et al. *Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule.* Biochem Biophys Res Commun, 1988. **157**(1): p. 87-94.

158. Stuehr, D.J., Nathan, C.F. *Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells.* J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1543-55.

159. Babior, B.M. *Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction.* Blood, 1984. **64**(5): p. 959-66.

160. Martin-Ventura, J.L., et al. *Erythrocytes, leukocytes and platelets as a source of oxidative stress in chronic vascular diseases: detoxifying mechanisms and potential therapeutic options.* Thromb Haemost, 2012. **108**(3): p. 435-42.

161. Betjes, M.G. *Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease.* Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(5): p. 255-65.

162. Guzik, T.J., Korbut, R., Adamek-Guzik, T. *Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.* J Physiol Pharmacol, 2003. **54**(4): p. 469-87.

163. Szabo, C., Ischiropoulos, H., Radi, R. *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics.* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(8): p. 662-80.

164. Ross, R. *Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy.* Transplant Proc, 1993. **25**(2): p. 2041-3.

165. Shao, B., et al. *Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein.* Curr Opin Cardiol, 2006. **21**(4): p. 322-8.

166. Esmon, C.T. *Does inflammation contribute to thrombotic events?* Haemostasis, 2000. **30 Suppl 2**: p. 34-40.

167. Sprague, A.H., Khalil, R.A. *Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease.* Biochem Pharmacol, 2009. **78**(6): p. 539-52.

168. Durante, W., Johnson, F.K., Johnson, R.A. *Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. **34**(9): p. 906-11.

169. Howren, M.B., Lamkin, D.M. Suls, J. *Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis.* Psychosom Med, 2009. **71**(2): p. 171-86.

170. Maes, M., et al. *The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression.* Metab Brain Dis, 2009. **24**(1): p. 27-53.

171. Nunes, S.O., et al. *A comparison of inflammatory markers in depressed and nondepressed smokers.* Nicotine Tob Res, 2012. **14**(5): p. 540-6.

172. Rosenblum, W.I. *Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen.* J Vasc Res, 1997. **34**(6): p. 409-17.

173. Maes, M., et al. *Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression.* Psychiatry Res, 1993. **49**(1): p. 11-27.

174. Rothermundt, M., et al. *Inflammatory markers in major depression and melancholia.* J Affect Disord, 2001. **63**(1-3): p. 93-102.

175. Dantzer, R., Kelley, K.W. *Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior.* Brain Behav Immun, 2007. **21**(2): p. 153-60.

176. Beck, A.T., Steer, R.A. *Internal consistencies of the original and revised Beck Depression Inventory.* J Clin Psychol, 1984. **40**(6): p. 1365-7.

177. Hamilton, M. *A rating scale for depression.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1960. **23**: p. 56-62.

178. Rajagopalan, S., et al. *Abnormal brachial artery flow-mediated vasodilation in young adults with major depression.* Am J Cardiol, 2001. **88**(2): p. 196-8, A7.

179. Dietrich-Muszalska, A., Wachowicz, B. *Platelet haemostatic function in psychiatric disorders: Effects of antidepressants and antipsychotic drugs.* World J Biol Psychiatry, 2016: p. 1-11.

180. Boyd, C.A., Crawford, D.H. *Activation of cationic amino acid transport through system y+ correlates with expression of the T-cell early antigen gene in human lymphocytes.* Pflugers Arch, 1992. **422**(1): p. 87-9.

181. Abrantes, D.C., et al. *Diminished nitric oxide generation from neutrophils suppresses platelet activation in chronic renal failure.* Mol Cell Biochem, 2015. **401**(1-2): p. 147-53.

182. Cortese-Krott, M.M., et al. *Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease.* Blood, 2012. **120**(20): p. 4229-37.

183. Hashimoto, R., et al. *Changes in the concentrations of tetrahydrobiopterin, the cofactor of tyrosine hydroxylase, in blood under physical stress and in depression.* Ann N Y Acad Sci, 2004. **1018**: p. 378-86.

184. Kietadisorn, R., Juni, R.P., Moens, A.L. *Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(5): p. E481-95.

185. Bachetti, T., et al. *Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions.* J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(2): p. 515-23.

186. Liu, C.S., et al. *Evidence for Inflammation-Associated Depression.* Curr Top Behav Neurosci, 2016.

187. Francis, S.H., et al. *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action.* Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 525-63.

188. Bendall, J.K., et al. *Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression.* Circ Res, 2005. **97**(9): p. 864-71.

189. Halliwell, B. *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.* Plant Physiol, 2006. **141**(2): p. 312-22.

190. Cerletti, C., et al. *Platelet-leukocyte interactions in thrombosis.* Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 263-6.

191. Totani, L., Evangelista, V. *Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(12): p. 2357-61.

192. Kleinbongard, P., et al. *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase.* Blood, 2006. **107**(7): p. 2943-51.

193. Uyuklu, M., Meiselman, H.J., Baskurt, O.K. *Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide.* Nitric Oxide, 2009. **21**(1): p. 20-6.

194. Brzeszczynska, J., Gwozdzinski, K. *Nitric oxide induced oxidative changes in erythrocyte membrane components.* Cell Biol Int, 2008. **32**(1): p. 114-20.

195. Brzeszczynska, J., Luciak, M., Gwozdzinski, K. *Alterations of erythrocyte structure and cellular susceptibility in patients with chronic renal failure: effect of haemodialysis and oxidative stress.* Free Radic Res, 2008. **42**(1): p. 40-8.

196. Sies, H. *Role of reactive oxygen species in biological processes.* Klin Wochenschr, 1991. **69**(21-23): p. 965-8.

197. Altamura, C., et al. *Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression.* Eur Neuropsychopharmacol, 1995. **5 Suppl**: p. 71-5.

198. Mauri, M.C., et al. *Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment.* Neuropsychobiology, 1998. **37**(3): p. 124-9.

199. Mitani, H., et al. *Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2006. **30**(6): p. 1155-8.

200. Zhong, Z., et al. *L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003. **6**(2): p. 229-40.

201. Schemmer, P., et al. *Glycine reduces platelet aggregation.* Amino Acids, 2013. **44**(3): p. 925-31.

202. Nakamura, I. *Impairment of innate immune responses in cirrhotic patients and treatment by branched-chain amino acids.* World J Gastroenterol, 2014. **20**(23): p. 7298-305.

203. Maes, M., et al. *Alterations in iron metabolism and the erythron in major depression: further evidence for a chronic inflammatory process.* J Affect Disord, 1996. **40**(1-2): p. 23-33.

204. Vandoolaeghe, E., et al. *Reduced number of red blood cells, lowered hematocrit and hemoglobin, and increased number of reticulocytes in major depression as indicators of activation of the inflammatory response system: effects of antidepressant drugs.* Hum Psychopharmacol Clin Exp, 1999. **14**: p. 45-52.

205. Lee, B.H., Kim, Y.K. *Reduced platelet BDNF level in patients with major depression.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2009. **33**(5): p. 849-53.

206. Ataoglu, A., Canan, F. *Mean platelet volume in patients with major depression: effect of escitalopram treatment.* J Clin Psychopharmacol, 2009. **29**(4): p. 368-71.

207. Musselman, D.L., et al. *Platelet reactivity in depressed patients treated with paroxetine: preliminary findings.* Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(9): p. 875-82.

208. McCabe, D.J., et al. *Increased platelet count and leucocyte-platelet complex formation in acute symptomatic compared with asymptomatic severe carotid stenosis.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005. **76**(9): p. 1249-54.

209. Molnar, M.Z., et al. *High platelet count as a link between renal cachexia and cardiovascular mortality in end-stage renal disease patients.* Am J Clin Nutr, 2011. **94**(3): p. 945-54.

210. Kop, W.J., et al. *Inflammation and coagulation factors in persons > 65 years of age with symptoms of depression but without evidence of myocardial ischemia.* Am J Cardiol, 2002. **89**(4): p. 419-24.

211. Wium-Andersen, M.K., Orsted, D.D., Nordestgaard, B.G. *Association between elevated plasma fibrinogen and psychological distress, and depression in 73,367 individuals from the general population.* Mol Psychiatry, 2013. **18**(8): p. 854-5.

212. Doulalas, A.D., et al. *Association of depressive symptoms with coagulation factors in young healthy individuals.* Atherosclerosis, 2006. **186**(1): p. 121-5.

213. Whooley, M.A., et al. *Depression and inflammation in patients with coronary heart disease: findings from the Heart and Soul Study.* Biol Psychiatry, 2007. **62**(4): p. 314-20.

214. Venugopal, A. *Disseminated intravascular coagulation.* Indian J Anaesth, 2014. **58**(5): p. 603-8.

215. Kessler, R.C. *Epidemiology of women and depression.* J Affect Disord, 2003. **74**(1): p. 5-13.

216. Piccinelli, M., Wilkinson, G. *Gender differences in depression. Critical review.* Br J Psychiatry, 2000. **177**: p. 486-92.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: **A via L-arginina-óxido nítrico e o estresse oxidativo associados às alterações imunológicas, inflamatórias e aterotrombóticas na depressão.**
Pesquisadores participantes: **Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro, Dra. Tatiana Malowe Cunha Brunini, Doutoranda Monique Bezerra Oliveira.**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Departamento de Farmacologia e Psicobiologia
Laboratório de Transporte de Membrana
Tel.: (21)28688041

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa acima como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela Doutoranda Monique Bezerra Oliveira sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação, assim como as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Foi-me esclarecido ainda que, por ser uma participação voluntária e sem interesse financeiro, não terei direito a nenhuma remuneração. Foi-me garantido que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do meu tratamento nesta instituição.

Rio de Janeiro, ___ de _____ de _____.

_____
Assinatura do sujeito ou responsável

Rio de Janeiro, ___ de _____ de _____.

_____
Assinatura do pesquisador responsável

APÊNDICE B – Ficha Clínica

Ficha Clínica

DADOS PESSOAIS

Nome:_____

Telefone: _____ e-mail: _____

Data de nascimento _____/_____/_____ Idade: _____ Sexo_____

Estado Civil_____ Profissão _____

Endereço_____

Cidade : _____ Estado:_____

ANAMNESE

Está em tratamento psicoterapêutico atualmente? ( ) Sim ( ) Não

Quanto tempo?_____

Está em tratamento médico atualmente? ( ) Sim ( ) Não Qual? _____

Atividade física? ( ) Sim ( ) Não Tempo:_____

Gravidez: ( ) Sim ( ) Não

Está fazendo uso de alguma medicação? ( ) Sim ( ) Não

Especifique: _____

Já foi operado? ( ) Sim ( ) Não Qual_____

Fez transfusão sanguínea recentemente? ( ) Sim ( ) Não

Sofre alguma das seguintes doenças?

Problemas cardíacos (cardiopatia isquêmica, ICC, HAS, prótese cardíaca): ( ) Sim ( ) Não

Problemas hepáticos: ( ) Sim ( ) Não

Problemas renais: ( ) Sim ( ) Não

Problemas gástricos: ( ) Sim ( ) Não

Problemas Respiratórios: ( ) Sim ( ) Não

Problemas alérgicos: ( ) Sim ( ) Não

Problemas Articulares ou Reumatismo: ( ) Sim ( ) Não

Problemas sanguíneos: ( ) Sim ( ) Não

Diabetes: ( ) Sim ( ) Não

Obesidade: ( ) Sim ( ) Não

Tabagismo: (atual/passado-tempo, numero de cigarros/dia): ( ) Sim ( ) Não

Alcoolismo: ( ) Sim ( ) Não

Histórico familiar de alguma das doenças acima? Especifique: _____

Peso: _____Kg Altura:_____m IMC: _____Kg/m^2

Circunferência da cintura: _____cm Pressão arterial: _____mmHg

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa HUPE/UERJ

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESOUISA

Rio de Janeiro, 03 de maio de 2006

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Paulo José D'Albuquerque Medeiros
Para: Prof. Antônio Cládio Mendes Ribeiro

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (1436-CEP/HUPE) "A VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO, TRANSTORNO DEPRESSIVO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUPE/UERJ

Prof. Paulo José D'Albuquerque Medeiros
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 77 TÉRREO - VILA ISABEL - CEP 20551-030
TEL: 21 2587-6353 – FAX: 21 2264-0853 - E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO B – Inventário de Beck para depressão

Inventário de Depressão de Beck

Nome: _____ Idade: _____ Estado Civil: _____ Profissão: _____

Escolaridade: _____ Data de aplicação: _____

Instruções

Neste questionário existem grupos de afirmações. Por favor leia cuidadosamente cada uma delas. A seguir seleccione a afirmação, em cada grupo, que melhor descreve como se sentiu NA SEMANA QUE PASSOU, INCLUINDO O DIA DE HOJE. Desenhe um círculo em torno do número ao lado da afirmação seleccionada. Se escolher dentro de cada grupo várias afirmações, faça um círculo em cada uma delas. Certifique-se que leu todas as afirmações de cada grupo antes de fazer a sua escolha.

1.
0 Não me sinto triste.
1 Sinto-me triste.
2 Sinto-me triste o tempo todo e não consigo evitá-lo.
3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.

2.
0 Não estou particularmente desencorajado(a) em relação ao futuro.
1 Sinto-me desencorajado(a) em relação ao futuro.
2 Sinto que não tenho nada a esperar.
3 Sinto que o futuro é sem esperança e que as coisas não podem melhorar.

3.
0 Não me sinto fracassado(a).
1 Sinto que falhei mais do que um indivíduo médio.
2 Quando analiso a minha vida passada, tudo o que vejo é uma quantidade de fracassos.
3 Sinto que sou um completo fracasso.

4.
0 Eu tenho tanta satisfação nas coisas, como antes.
1 Não tenho satisfações com as coisas, como costumava ter.
2 Não consigo sentir verdadeira satisfação com alguma coisa.
3 Estou insatisfeito(a) ou entediado(a) com tudo.

5.
0 Não me sinto particularmente culpado(a).
1 Sinto-me culpado(a) grande parte do tempo.
2 Sinto-me bastante culpado(a) a maior parte do tempo.
3 Sinto-me culpado(a) durante o tempo todo.

6.
0 Não me sinto que esteja a ser punido(a).
1 Sinto que posso ser punido(a).
2 Sinto que mereço ser punido(a).
3 Sinto que estou a ser punido(a).

7.
0 Não me sinto desapontado(a) comigo mesmo(a).
1 Sinto-me desapontado(a) comigo mesmo(a).
2 Sinto-me desgostoso(a) comigo mesmo(a).
3 Eu odeio-me.

8.
0 Não me sinto que seja pior que qualquer outra pessoa.
1 Critico-me pelas minhas fraquezas ou erros.
2 Culpo-me constantemente pelas minhas faltas.
3 Culpo-me de todas as coisas más que acontecem.

9.
0 Não tenho qualquer ideia de me matar.
1 Tenho ideias de me matar, mas não sou capaz de as concretizar.
2 Gostaria de me matar.
3 Matar-me-ia se tivesse uma oportunidade.

10.
0 Não costumo chorar mais do que o habitual.
1 Choro mais agora do que costumava fazer.
2 Actualmente, choro o tempo todo.
3 Eu costumava conseguir chorar, mas agora não consigo, ainda que queira.

11.
0 Não me irrito mais do que costumava.
1 Fico aborrecido(a) ou irritado(a) mais facilmente do que costumava.
2 Actualmente, sinto-me permanentemente irritado(a).
3 Já não consigo ficar irritado(a) com as coisas que antes me irritavam.

17.
0 Não fico mais cansado(a) do que o habitual.
1 Fico cansado(a) com mais dificuldade do que antes.
2 Fico cansado(a) ao fazer quase tudo.
3 Estou demasiado cansado(a) para fazer qualquer coisa.

12.
0 Não perdi o interesse nas outras pessoas.
1 Interesso-me menos do que costumava pelas outras pessoas.
2 Perdi a maior parte do meu interesse nas outras pessoas.
3 Perdi todo o meu interesse nas outras pessoas.

13.
0 Tomo decisões como antes.
1 Adio as minhas decisões mais do que costumava.
2 Tenho maior dificuldade em tomar decisões do que antes.
3 Já não consigo tomar qualquer decisão.

14.
0 Não sinto que a minha aparência seja pior do que costumava ser.
1 Preocupo-me porque estou a parecer velho(a) ou nada atraente.
2 Sinto que há mudanças permanentes na minha aparência que me tornam nada atraente.
3 Considero-me feio(a).

15.
0 Não sou capaz de trabalhar tão bem como antes.
1 Preciso de um esforço extra para começar qualquer coisa.
2 Tenho que me forçar muito para fazer qualquer coisa.
3 Não consigo fazer nenhum trabalho.

16.
0 Durmo tão bem como habitualmente.
1 Não durmo tão bem como costumava.
2 Acordo 1 ou 2 horas antes que o habitual e tenho dificuldade em voltar a adormecer.
3 Acordo várias vezes mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir.

18.
0 O meu apetite é o mesmo de sempre.
1 Não tenho tanto apetite como costumava ter.
2 O meu apetite, agora, está muito pior.
3 Perdi completamente o apetite.

19.
0 Não perdi muito peso, se é que perdi algum ultimamente.
1 Perdi mais de 2,5 kg.
2 Perdi mais de 5 kg.
3 Perdi mais de 7,5 kg.

Estou propositadamente a tentar perder peso, comendo menos.
Sim ____ Não ____

20.
0 A minha saúde não me preocupa mais do que o habitual.
1 Preocupo-me com problemas físicos, como dores e aflições, má disposição do estômago, ou prisão de ventre.
2 Estou muito preocupado(a) com problemas físicos e torna-se difícil pensar em outra coisa.
3 Estou tão preocupado(a) com os meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa.

21.
0 Não tenho observado qualquer alteração recente no meu interesse sexual.
1 Estou menos interessado(a) na vida sexual do que costumava.
2 Sinto-me, actualmente, muito menos interessado(a) pela vida sexual.
3 Perdi completamente o interesse na vida sexual.

Total: _____ **Classificação:** _____

ANEXO C – Escala de Hamilton para depressão

Escala de Hamilton - Depressão

Todos os ítens devem ser preenchidos. Assinalar o número apropriado.

1. HUMOR DEPRIMIDO (Tristeza, desesperança, desamparo, inutilidade)
0. Ausente.
1.Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido.
2.Sentimentos relatados espontaneamente com palavras.
3.Comunica os sentimentos não com palavras, isto é, com a expressão facial, a postura, a voz e a tendência ao choro.
4. Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não-verbal do paciente.

2. SENTIMENTOS DE CULPA
0. Ausente
1. Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros.
2. Idéias de culpa ou ruminação sobre erros passados ou más ações.
3. A doença atual é um castigo.
4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras.

3. SUICÍDIO
0. Ausente.
1. Sente que a vida não vale a pena.
2. Desejaria estar morto ou pensa na probabilidade de sua própria morte.
3. Idéias ou gestos suicidas.
4.Tentativa de suicídio (qualquer tentativa séria, marcar 4).

4. INSÔNIA INICIAL
0. Sem dificuldades para conciliar o sono.
1. Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora.
2. Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites.

5. INSÔNIA INTERMEDIÁRIA
0. Sem dificuldades.
1. O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite.
2. Acorda à noite - qualquer saída da cama marcar 2(exceto p/ urinar).

6. INSÔNIA TARDIA
0. Sem dificuldades.
1. Acorda de madrugada, mas volta a dormir
2. Incapaz de voltar a conciliar o sono se deixar a cama.

7. TRABALHO E ATIVIDADES
0. Sem dificuldades.
1. Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionada a atividades, trabalho ou passatempos.
2. Perda de interesse por atividades (passatempos ou trabalho) quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade).
3. Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos 3 horas por dia em atividades externas (trabalho hospitalar ou passatempo).
4. Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem ajuda.

8. RETARDO (lentidão de idéias e fala; dificuldade de concentração; atividade motora diminuída)

0. Pensamento e fala normais.
1. Leve retardo à entrevista.
2. Retardo óbvio à entrevista.
3. Entrevista difícil.
4. Estupor completo.

9. AGITAÇÃO
0. Nenhuma.
1. Inquietude.
2. Brinca com as mãos, com os cabelos,etc.
3. Mexe-se, não consegue sentar quieto.
4. Torce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios.

10. ANSIEDADE PSÍQUICA
0.Sem dificuldade.
1. Tensão e irritabilidade subjetivas.
2. Preocupação com trivialidades.
3. Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala.
4. Medos expressos sem serem inquiridos.

11.ANSIEDADE SOMÁTICA
Concomitantes fisiológicos de ansiedade, tais como:
Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indisgestão, diarréia, cólicas, eructação; Cardiovasculares: palpitações, cefaléia; Respiratórios: hiperventilação, suspiros; Freqüência urinária; Sudorese
0. Ausente :
1. Leve
2. Moderada
3. Grave
4. Incapacitante

12. SINTOMAS SOMÁTICOS GASTRINTESTINAIS
0. Nenhum
1. Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente. Sensações de peso no abdomen
2. Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos.

13. SINTOMAS SOMÁTICOS EM GERAL
0. Nenhum
1. Peso nos membros, nas costas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaléia, mialgias.
Perda de energia e cansaço.
2. Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2.

14. SINTOMAS GENITAIS
Sintomas como: perda da libido, distúrbios menstruais
0. Ausentes
1. Leves
2. Intensos

15. HIPOCONDRIA
0. Ausente
1. Auto-observação aumentada (com relação ao corpo)
2. Preocupação com a saúde
3. Queixas freqüentes, pedidos de ajuda,etc.
4. Idéias delirantes hipocondríacas.

16. PERDA DE PESO (Marcar A ou B)
A - Quando avaliada pela história clínica
0. Sem perda de peso.
1. Provável perda de peso associada à moléstia atual.
2. Perda de peso definida (de acordo com o paciente)
3. Não avaliada.

B - Avaliada semanalmente pelo psiquiatra responsável, quando são medidas alterações reais de peso
0. Menos de 0,5 Kg de perda por semana.
1. Mais de 0,5 Kg de perda por semana.
2. Mais de 1 Kg de perda por semana.
3. Não avaliada.

17. CONSCIÊNCIA
0. Reconhece que está deprimido e doente.
1. Reconhece a doença mas atribui-lhe a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, à necessidade de repouso, etc.
2. Nega estar doente.

18. VARIAÇÃO DIURNA

A - Observar se os sintomas são piores pela manhã ou à tarde. Caso NÃO haja variação, marcar "nenhuma".
0. Nenhuma
1. Pior de manhã.
2. Pior à tarde.

B - Quando presente, marcar a gravidade da variação. Marcar "nenhuma" caso NÃO haja variação.
0. Nenhuma.
1. Leve
2. Grave

NOTA: Caso haja variação diurna, só a contagem referente à sua gravidade (1 ou 2 pontos no ítem 18B) é que deve ser incluída na contagem final. O ítem 18 A não deve ser computado.

19. DESPERSONALIZAÇÃO E PERDA DE NOÇÃO DE REALIDADE
Tais como: sensações de irrealidade, idéias niilistas
0. Ausente
1. Leve.
2. Moderadas.
3. Graves.
4. Incapacitantes.

20. SINTOMAS PARANÓIDES
0. Nenhum.
1. Desconfiança.
2. Idéias de referência.
3. Delírio de referência e perseguição.

21. SINTOMAS OBSESSIVOS E COMPULSIVOS
0. Nenhum.
1. Leves.
2. Graves.

SOMAR OS PONTOS OBTIDOS EM TODOS OS ÍTENS (EXCETO 18 A)
CONTAGEM TOTAL: ____(0-62)

ANEXO D – Comentários sobre o artigo e confirmação da submissão da revisão do artigo

Dear Dr. Cristiane Matsuura,

Your manuscript entitled "An investigation of L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative status in neutrophils from untreated depressive patients", which you submitted to The World Journal of Biological Psychiatry, has been reviewed and was found to be of potential interest. The reviewer comments are included at the bottom of this letter.

When you choose to revise your manuscript please highlight the changes you make in the manuscript by using the track changes mode in MS Word or by using bold or coloured text. Furthermore, your resubmission shall be accompanied by a cover letter, describing in detail how you have responded, point by point, to the reviewers' comments.

To submit the revision, log into http://mc.manuscriptcentral.com/swbp and enter your Author Centre, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision. Please enter your responses to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you made to the original manuscript. Please be as specific as possible in your response to the reviewer(s).

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to The World Journal of Biological Psychiatry, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision before 15-Nov-2016, please contact the Editorial Office to discuss available options: wfsbp@meduniwien.ac.at

Once again, thank you for submitting your manuscript to The World Journal of Biological Psychiatry and we look forward to receiving your revision. However, please understand that we cannot guarantee your manuscript will be accepted.

Sincerely yours,

Prof. Siegfried Kasper

Chief Editor, The World Journal of Biological Psychiatry

Prof. Rainer Rupprecht

Assistant Chief Editor, The World Journal of Biological Psychiatry

Contact:

The World Journal of Biological Psychiatry Editorial Office

E-mail: wfsbp@meduniwien.ac.at

Editor's Comments to Author:

Assistant Chief Editor: 1

Comments to the Author:

(There are no comments.)

Field Editor: 2

Comments to the Author:

(There are no comments.)

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

The authors confirmed the impaired NO and cGMP bioavailability and reduced levels of BCAAs and L-glycine in untreated MDD patients than in control subjects. In addition, the correlation between immune dysregulation induced by those results and thrombosis was discussed. These results were insightful to understand mechanism of cardiovasucular mortality and immune dysregulation in MDD patients. However, there are some major points to achieve the publication in the journal.

Major points

1. In introduction section, the authors indicated several points (immune dysregulation, oxidative stress, etc) about cardiovascular disease in MDD patients. However in discussion section, the increased platelet aggregation and endothelial dysfunction were emphasized. The relationship between introduction and discussion sections was unclear.

2. The depressed symptoms of MDD patients were assessed using HAMD-17 and BDI. The authors should show those scores (average ± S.D.) and discuss correlation between those scores and some biochemical parameters.

3. The authors measured and discussed NO cascade including oxidative stress, amino acids concentrations, and platelet aggregation in neutrophils. However in discussion section, three issues

were discussed separately. I think that particularly amino acids concentrations were no need in this paper. If the authors discuss those three issues, it is need to analyze and discuss those relationships.

4. Sample size is too small to lead this conclusion. There may be type I and II error.

5. There are significant differences in RBC, haemoglobin, platelet count, and fibrinogen plasma levels between MDD and control groups. Although those levels were within the normal range, it is better to discuss about these points. Several researches about RBC (PMID: 9925192), platelet (PMID: 26924994, PMID: 23948792), and fibrinogen (PMID: 26081315, PMID: 24473443) between MDD and control subjects were published.

Minor points

1. More reference need.

In discussion, the statement “Confirming the low NO levels, cGMP levels were also found to be reduced in depressive patients”.

Reviewer: 2

Comments to the Author

The manuscript evaluated neutrophil L-arginine influx, NO synthase activity, cGMP and amino acid levels, oxidative burst, iNOS, eNOS and NADPH oxidase gp91phox expression, and platelet aggregation in 14 untreated MDD patients and 15 controls. Although it presents some promising results, there are several points that need to be addressed by the authors.

Page 4- the last two sentences of the first paragraph are awkwardly phrased and should be reworded for clarity purposes.

There are many factors that are well reported to influence mood that apparently were no controlled in this study. Were there any other inclusion/ exclusion criteria applied? Factors that should be considered use of medications, illnesses (acute or chronic), tabagism, physical activity.

The low sample size is a limitation of the study. In addition, a similar female and male number of individuals would be important to assess gender effect on the evaluated parameters.

Measurement of amino acid concentrations in neutrophils: a brief description of the method with an appropriate reference is missing. References are also missing for oxidative burst, and platelet aggregation.

The results obtained in the statistical analysis should be provided.

Data from aminoacid content have high SEM.

A comment regarding the differences in clinical data between MMD patients and controls should be included in the discussion section.

Submission Confirmation

Print

Thank you for your revision

Submitted to
The World Journal of Biological Psychiatry

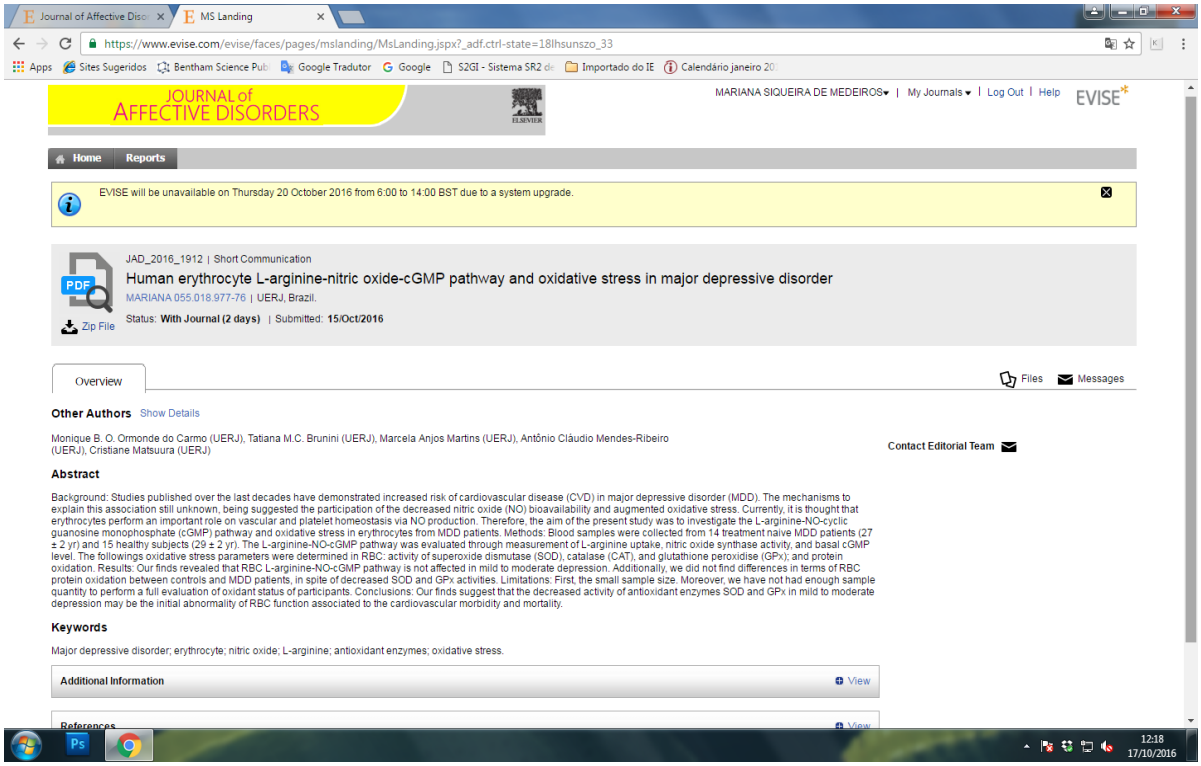
Manuscript ID
SWBP-2016-0126.R1

Title
An investigation of L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative status in neutrophils from untreated depressive patients

Authors
Ormonde do Carmo, Monique
Brunini, Tatiana
Abrantes, Daniele
Mendes Ribeiro, Antonio Claudio
Medeiros, Mariana
Matsuura, Cristiane

Date Submitted
17-Oct-2016

ANEXO E – Comprovante de submissão de artigo



JOURNAL of AFFECTIVE DISORDERS

MARIANA SIQUEIRA DE MEDEIROS | My Journals | Log Out | Help EVISE

Home | Reports

EVISE will be unavailable on Thursday 20 October 2016 from 6:00 to 14:00 BST due to a system upgrade.

JAD_2016_1912 | Short Communication

Human erythrocyte L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway and oxidative stress in major depressive disorder

MARIANA 055.018.977-76 | UERJ, Brazil.

Status: **With Journal (2 days)** | Submitted: **15/Oct/2016**

Zip File

Overview | Files | Messages

Other Authors Show Details

Monique B. O. Ormonde do Carmo (UERJ), Tatiana M.C. Brunini (UERJ), Marcela Anjos Martins (UERJ), Antônio Cláudio Mendes-Ribeiro (UERJ), Cristiane Matsuura (UERJ)

Contact Editorial Team

Abstract

Background: Studies published over the last decades have demonstrated increased risk of cardiovascular disease (CVD) in major depressive disorder (MDD). The mechanisms to explain this association still unknown, being suggested the participation of the decreased nitric oxide (NO) bioavailability and augmented oxidative stress. Currently, it is thought that erythrocytes perform an important role on vascular and platelet homeostasis via NO production. Therefore, the aim of the present study was to investigate the L-arginine-NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway and oxidative stress in erythrocytes from MDD patients. Methods: Blood samples were collected from 14 treatment naive MDD patients (27 ± 2 yr) and 15 healthy subjects (29 ± 2 yr). The L-arginine-NO-cGMP pathway was evaluated through measurement of L-arginine uptake, nitric oxide synthase activity, and basal cGMP level. The followings oxidative stress parameters were determined in RBC: activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidise (GPx); and protein oxidation. Results: Our finds revealed that RBC L-arginine-NO-cGMP pathway is not affected in mild to moderate depression. Additionally, we did not find differences in terms of RBC protein oxidation between controls and MDD patients, in spite of decreased SOD and GPx activities. Limitations: First, the small sample size. Moreover, we have not had enough sample quantity to perform a full evaluation of oxidant status of participants. Conclusions: Our finds suggest that the decreased activity of antioxidant enzymes SOD and GPx in mild to moderate depression may be the initial abnormality of RBC function associated to the cardiovascular morbidity and mortality.

Keywords

Major depressive disorder; erythrocyte; nitric oxide; L-arginine; antioxidant enzymes; oxidative stress.

Additional Information View

References View