



**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES MOLECULARES NO
TRANSTORNO DEPRESSIVO RESISTENTE ATRAVÉS DA ABORDAGEM *IN*
*SÍLICO***

Mayara Thais Moreira

CAXIAS DO SUL

2023

Mayara Thais Moreira

**INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES MOLECULARES NO
TRANSTORNO DEPRESSIVO RESISTENTE ATRAVÉS DA ABORDAGEM *IN*
*SÍLICO***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Colombo

Co-Orientadora: Prof. Dra. Scheila de Avila e Silva

CAXIAS DO SUL
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

M838i Moreira, Mayara Thais

Investigação de potenciais marcadores moleculares no transtorno depressivo resistente através da abordagem in silico [recurso eletrônico] / Mayara Thais Moreira. – 2023.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2023.

Orientação: Rafael Colombo.

Coorientação: Scheila de Avila e Silva.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Depressão mental. 2. Farmacologia. 3. Genética molecular. I. Colombo, Rafael, orient. II. Silva, Scheila de Avila e, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 616.89-008.454

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

**INVESTIGAÇÃO DE POTENCIAIS MARCADORES MOLECULARES NO
TRANSTORNO DEPRESSIVO RESISTENTE ATRAVÉS DA
BIOINFORMÁTICA**

Mayara Thais Moreira

Dissertação submetida a banca examinadora designada pela coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 16 de Junho de 2023

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr Rafael Colombo
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva
Universidade de Caxias do Sul - UCS

Prof. Dr. Rafael Dultra de Armas
Centro Universitário Católica de Santa Catarina

Prof^a. Dra. Adriane Ribeiro Rosa
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Prof. Rafael Colombo, pela orientação, competência e dedicação tão importantes. Por todas as reuniões e discussões que só enriqueceram o trabalho e meu crescimento acadêmico. Agradeço por acreditar em mim e me incentivar a fazer sempre o melhor e mais completo possível.

À Dra. Prof. Scheila de Avila e Silva, como coorientadora e guia nos novos desafios explorando a pesquisa *in silico*. Agradeço por todas as explicações, apoios e oportunidades que você me proporcionou, a reconheço como modelo e fico feliz em poder tê-la como coorientadora.

Aos membros da banca examinadora, Prof^ª. Dra. Adriane Ribeiro Rosa, Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva e Prof. Dr. Rafael Dultra de Armas que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

À equipe que me auxiliou na leitura dos inúmeros artigos, Vitor Silveira Frank, Ellen Scotton, Helena, Laura, Vitória, Letícia Casagrande e Jennifer C. Santos, agradeço o empenho e dedicação ao trabalho, viabilizando esse estudo com grande riqueza de informações.

Aos meus pais Rhona Schott Moreira e Cláudio Sérgio Moreira, por me apoiarem e incentivarem a seguir os meus sonhos, que nos momentos de realizações vibraram e nos momentos difíceis me levantaram e auxiliaram a continuar lutando. E ao meu irmão Thiago Henrique Moreira que nunca falhou em me guiar e ajudar.

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	7
LISTA DE QUADROS	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DE LITERATURA	14
OBJETIVOS.....	18
Objetivo Geral	18
Objetivos específicos.....	18
METODOLOGIA.....	19
Tipificação da pesquisa	19
Busca dos artigos.....	19
Triagem e curadoria manual dos artigos.....	20
Seleção de proteínas	22
Construção da rede de interação proteína-proteína	22
Cálculo de ponto de corte	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
Rede <i>Rattus norvegicus</i>	25
Rede <i>Mus musculus</i>	28
Rede <i>Homo sapiens</i>	30
Intersecção das redes.....	32
CONCLUSÃO	40
PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	41
APÊNDICE	42
ABSTRACT	42
KEYWORDS	42
INTRODUCTION	43
METHODOLOGY	44
Typification of research	44
Article Search	44
Manual sorting and curation of the articles	44
Protein selection	45
Building the protein-protein interaction network	45

Calculation of cut-off point	45
RESULTS.....	46
<i>Rattus norvegicus</i> network.....	46
<i>Mus musculus</i> Network.....	46
<i>Homo sapiens</i> Network.....	46
Network Intersection	47
Central Networks	47
Prefrontal cortex	47
Hippocampus	47
DISCUSSION.....	48
CONCLUSION	50
REFERENCES	50
FIGURES.....	53
FIGURE CAPTIONS	60
COVER LETTER	61
REFERÊNCIAS.....	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT – Serotonina
5-HT_{2A} – Subunidade 2A do Receptor de Serotonina
ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico
AKT – Proteína Quinase B
AMPA - Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
APOE - Apolipoproteína E
Arc - Proteína Associada ao Citoesqueleto Regulada por Atividade
ATCs - Antidepressivos Tricíclicos Convencionais
BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
Ca⁺ - Ion de Cálcio
CD4 – Linfócito T CD4
CREB1 - Proteína de ligação ao elemento responsivo CAMP 1
CRH - Hormônio Liberador de Corticotropina
DA – Dopamina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
Drd1 – Receptor D1 de Dopamina
GDNF – Fator Neurotrófico de Células Derivadas da Glia
Gria1 – Receptor Ionotrópico de glutamato 1
Gria2 - Receptor Ionotrópico de glutamato 2
Gria4 - Receptor Ionotrópico de glutamato 4
Grin1 - Subunidade zeta-1 do receptor de glutamato (NMDA)
Grin2a - Subunidade epsilon-1 do receptor de glutamato (NMDA)
Grin2b - Subunidade epsilon-2 do receptor de glutamato (NMDA)
GRs - Receptores de Glicocorticóides
Gsk3b - Glicogênio Sintase Quinase 3 beta
HDL – Lipoproteína de alta densidade
HGNC - Comitê de Nomenclatura Genética da HUGO
HPA - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HTR7 – Receptor 5-HT₇

ID - Identificação

IL - Interleucina

IMAO - Inibidores da Monoamino-oxidase

ISRS - Inibidor seletivo de recaptção de serotonina

MAO - Monoamina oxidase

Mapk1 – Gene que codifica a proteína quinase 1 ativada por mitógeno

Mapk3 - Gene que codifica a proteína quinase 3 ativada por mitógeno

mRNA - Ácido Ribonucleico mensageiro

mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NA - Noradrenalina

Na⁺ - Íon de Sódio

NCBI – Centro nacional de informações em biotecnologia

NE – Norepinefrina

NMDA - N-metil D-Aspartato

Nrtk2 - Receptor de tropomiosina quinase B

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPMR1 – Receptor opioide mu 1

PCR – Proteína C reativa

RNA – Ácido Ribonucleico

SIRT1 – Sirtuína 1

SLC6A4 - Gene Codificador do Transportador de Serotonina

TDM – Transtorno Depressivo Maior

TDR – Transtorno Depressivo Resistente

TNF – Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Definição dos constructos utilizados.

Quadro 02 – Descrição dos dados coletados dos artigos estudados.

Quadro 03 – Resumo dos resultados.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.
- Figura 02 – Estruturas químicas do triptofano, 5-hidroxitriptofano e serotonina.
- Figura 03 – Metodologia de seleção de artigo incluídos ou excluídos do estudo.
- Figura 04 - Quadro parcial de dados das proteínas e genes relacionados a TDR
- Figura 05 – Fluxograma da construção das redes
- Figura 06 – Fórmula do erro médio quadrático
- Figura 07 – Rede de interação proteína-proteína *Rattus norvegicus*
- Figura 08 – Rede de proteínas selecionadas *Rattus norvegicus*
- Figura 09 - Rede de interação proteína-proteína *Mus musculus*
- Figura 10 - Rede de interação de proteínas selecionadas *Mus musculus*.
- Figura 11 – Rede de interação proteína-proteína em *Homo sapiens*
- Figura 12 – Rede de proteínas selecionadas para *Homo sapiens*.
- Figura 13 – Intersecção das redes dos modelos de depressão.
- Figura 14 – Rede de proteínas com ação no córtex pré-frontal de camundongo
- Figura 15 – Rede de proteínas referente ao córtex pré-frontal em ratos
- Figura 16 – Rede de interação proteína-proteína no córtex pré-frontal humano
- Figura 17- Rede de interação proteína-proteína no hipocampo em camundongos
- Figura 18 – Rede de interação proteína-proteína no hipocampo de ratos.
- Figura 19 – Rede de interação proteína-proteína no hipocampo em humanos.

RESUMO

O transtorno depressivo maior é uma doença que afeta em torno de 320 milhões de pessoas no mundo, sendo que em torno de 50 a 60% desses indivíduos não responde adequadamente aos fármacos de primeira linha. Ainda não conhecemos os marcadores moleculares envolvidos com a falha na resposta farmacológica. Dessa forma, este trabalho utilizou análises *in silico* em três organismos para auxiliar nessa avaliação. Foi realizada uma revisão sistemática da literatura a partir dos artigos publicados na base de dados PubMed, foi feita a triagem e curadoria manual dos artigos, assim como a seleção de proteínas e genes relacionados ao TDR. Assim, pôde-se construir uma rede de interação proteína-proteína para cada organismo, sendo que foram derivadas destas outras redes de proteínas com ação central em regiões como córtex pré-frontal e hipocampo. Com isso chegou-se a proteínas como subunidade do receptor AMPA (Gria4), proteínas relacionadas com sobrevivência e plasticidade neuronal (BDNF e Mapk1) e proteínas relacionadas à transcrição do BDNF (AKT1, mTOR e Creb1) reguladas para baixo. E, proteínas como subunidades do receptor de glutamato NMDA (Grin1, Grin2, Grin2b e Grin3a), proteínas relacionadas a sinalização de morte celular e necrose (Gsk3a, Gsk3b e TNF), Proteína relacionada à conversão de triptofano em quinurenina (Ido1) e interleucinas pró inflamatórias (Il1b e Il6) reguladas para cima. Dessa forma acredita-se que essas proteínas podem ser potenciais marcadores do TDR, podendo ser utilizados para estudos pré-clínicos como alvos terapêuticos na psiquiatria de alta-performance.

ABSTRACT

Major depressive disorder is a disease that affects around 320 million people worldwide, and about 50 to 60% of these individuals do not respond to first-line drugs. We still don't have knowledge about the molecular markers involved in the failure in pharmacological response. Thus, this work used in silico analysis in three organisms to assist in this evaluation. A systematic literature review was performed from the articles published in the PubMed database, those articles were screened and manually curated, as well as the selection of proteins and genes related to TRD. Therefore, a protein-protein interaction network could be constructed for each organism, and other protein networks with central action in regions such as prefrontal cortex and hippocampus were derived from these networks. This led to proteins such as AMPA receptor subunit (Gria4), proteins related to neuronal survival and plasticity (BDNF and Mapk1) and proteins related to down-regulated BDNF transcription (AKT1, mTOR and Creb1). And proteins such as NMDA glutamate receptor subunits (Grin1, Grin2, Grin2b and Grin3a), proteins related to cell death and necrosis signaling (Gsk3a, Gsk3b and TNF), tryptophan-to-kynurenine conversion-related protein (Ido1) and pro-inflammatory interleukins (Il1b and Il6) up-regulated. In this way we believe that these proteins may be potential markers of TRD and could be used for preclinical studies as therapeutic targets in high-performance psychiatry.

INTRODUÇÃO

Um dos transtornos mentais mais recorrentes e incapacitante é o transtorno depressivo maior (TDM). Ele acomete mais de 320 milhões pessoas no mundo, sendo que o agravamento do transtorno pode levar a circunstâncias críticas como o suicídio. Mais de 150.000 internações por ano no Brasil são relacionadas à esquizofrenia e transtornos psiquiátricos comuns, isso corresponde a um gasto anual médio de US\$ 67,216,056 com despesas hospitalares (CAMERON et al., 2014; CARTERI et al., 2020).

O tratamento para a depressão é realizado a partir de fármacos, psicoterapia ou métodos alternativos como estimulação eletromagnética do córtex pré-frontal. Porém, ainda havendo fármacos com diferentes mecanismos de ação, a resistência aos antidepressivos é recorrente no tratamento do TDM. Cerca de 50% a 60% dos indivíduos tratados não apresentam recuperação significativa dos sintomas depressivos, mesmo utilizando múltiplos medicamentos. Esse quadro é caracterizado pelo transtorno depressivo resistente (TDR) (ZUSKY, 1988; FAVA, 2003).

Por conta do número significativo de pacientes que apresentam o transtorno depressivo resistente, ou seja, que possuem uma falha na resposta ao tratamento de pelo menos 2 medicamentos distintos administrados, a necessidade de investigação acerca de estratégias e alternativas para o tratamento desses pacientes é de fundamental relevância (SWAINSON et al., 2019). Porém, ainda que existam informações que levantem hipóteses sobre os mecanismos envolvidos com a resistência farmacológica na depressão, os dados apresentados na literatura são escassos e inconclusivos.

REVISÃO DE LITERATURA

O transtorno depressivo maior (TDM) é uma desordem mental recorrente e incapacitante, que acomete mais de 320 milhões pessoas no mundo. Uma vez não tratada afeta gravemente os ambientes familiares, de trabalho e sociais, sendo que a pessoa pode assumir uma condição inábil de realizar atividades psíquicas e motoras. A disfunção é caracterizada por episódios de humor depressivo e perda de interesse ou prazer em quase todas as atividades, ao longo de, ao menos, duas semanas. Além dessas características, a classificação do TDM é realizada a partir de uma lista de nove sintomas, levando em consideração a recorrência e gravidade dos episódios (DSM-5, 2014; CAMERON et al., 2014;). Ainda, o agravamento do transtorno pode levar a circunstâncias críticas como por exemplo o suicídio. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) 800 mil pessoas cometem suicídio anualmente, sendo que a correlação entre transtornos mentais e o suicídio já está fortemente estabelecida (BĂDESCU et al., 2016; JAKUSZKOWIAK-WOJTEN, 2019; OPAS, 2020).

O desenvolvimento do TDM é resultado de uma combinação de fatores ambientais, fisiológicos e genéticos. Dentre os mecanismos genéticos associados ao TDM encontram-se a acetilação ou desacetilação de histonas, mutações no DNA, metilação e hidroximetilação do DNA e os mecanismos dos RNA não codificantes. A desacetilação das histonas, por exemplo, afeta a modulação da expressão gênica, uma vez que há a condensação da cromatina e os fatores transcricionais são impedidos de se ligar na fita de DNA. Estudos trazem alguns dos genes relacionados com o TDM, tais como, o GDNF, SIRT1, SLC6A4, 5-HT2a e APOE (HAN, 2012; UCHIDA et al., 2018; FAN et al., 2019).

Além disso, a correlação entre a inflamação e a depressão, levantada por Smith (1991), possibilitou que outros estudos fossem realizados, onde foram apresentadas evidências da relação entre a sinalização pró-inflamatória e a presença de sintomas depressivos (KIM and MAES, 2003; KIM et al 2015). Sob uma situação de estresse ocorre a ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), a partir da secreção de Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH) pelo hipotálamo. O CRH irá estimular a glândula pituitária a produzir e liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez irá promover a produção de cortisol pela glândula adrenal. O aumento dos níveis de cortisol resulta na diminuição da produção do CRH por feedback negativo (DE KLOET et al., 1998.) A atividade exacerbada do eixo HPA promove o aumento dos

níveis de cortisol, devido a diminuição da sensibilidade dos receptores de glicocorticóides (GRs) e uma resposta atenuada do feedback negativo (Figura 01) (KIM, et al. 2015).

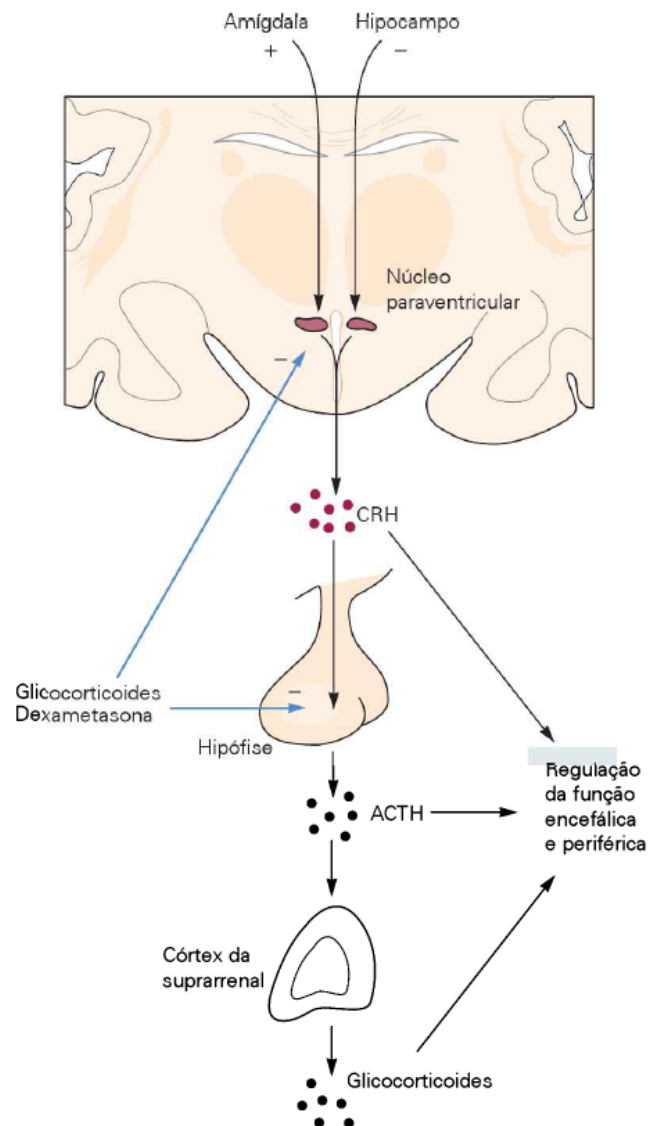


Figura 01 - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.

(Fonte: KANDEL, 2014)

Estudos demonstram que o nível aumentado de cortisol a longo prazo induz um aumento na sensibilidade dos receptores b-adrenérgicos, e um aumento dos níveis plasmáticos das catecolaminas. Há evidências, da formação de leucócitos polimorfonucleares por conta da exposição prolongada à altos níveis de epinefrina, isso gera um aumento na expressão de citocinas pró inflamatórias, como IL-2, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF), que estão relacionadas positivamente com sintomas

depressivos e comportamento suicida (KIM, et al. 2014; PERRY e REID 1993; SOUSA, et al. 2015).

O processo de síntese da serotonina pode ser afetado negativamente pelo aumento nas concentrações de cortisol. Sabe-se que o precursor da serotonina (5-hidroxitriptamina) é o triptofano, de forma que a enzima triptofano hidroxilase o converte em 5-hidroxitriptofano. Este perderá seu grupamento carboxila (-COOH) na cadeia orgânica por meio da ação da 5-hidroxitriptofano descarboxilase, formando, assim, a serotonina (NOLTE, 2002). Com os níveis de cortisol elevados, enzima triptofano hidroxilase é inibida, e assim, o triptofano proveniente da dieta tende a ser convertido em quinurenina, substância neurotóxica diminuindo a síntese de serotonina. Outro fator afetado pelo aumento dos níveis de cortisol é a expressão dos receptores de serotonina. A elevação dos níveis de cortisol promove uma diminuição dos RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam esses receptores, resultando em uma menor quantidade de receptores sintetizados, diminuindo também a capacidade de ligação e ação da serotonina (WOLKOWITZ, 1999; SARAIVA, 2005). Dessa forma, esses eventos associados irão gerar a diminuição dos níveis cerebrais de serotonina e uma menor ação sobre os seus receptores, intensificando o quadro característico do TDM.

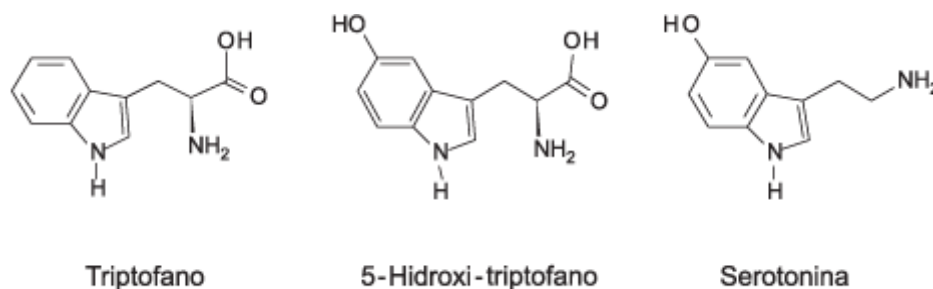


Figura 02 – Estruturas químicas do triptofano, 5-hidroxitriptofano e serotonina.

(Fonte: Martins et al., 2010)

Dentre os primeiros fármacos utilizados no tratamento da depressão se encontram os inibidores da monoamino-oxidase (IMAO). As aminas biogênicas são inativadas pela atividade dessa enzima oxidativa.. A MAO pode ser encontrada em duas isoformas distintas: MAO-A e MAO-B, sendo que a MAO-A possui uma preferência pela norepinefrina (NE) e serotonina (5-HT), em contrapartida a MAO-B atua preferencialmente sobre a dopamina (DA) (BALDESSARINI et al, 1996; GLOVER,

1977). Em decorrência da síntese de derivados benzodiazepínicos, foram descobertos em 1951 os antidepressivos tricíclicos convencionais (ATCs), que atuam na inibição não-seletiva da recaptação da NE, 5-HT, e em menor proporção da DA. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) foram considerados uma nova classe de fármacos antidepressivos com o surgimento da fluoxetina, pois esse fármaco se mostrou altamente seletivo para a inibição da recaptação de 5-HT.

Mesmo havendo fármacos com diferentes mecanismos de ação, a resistência aos antidepressivos é uma característica comum no tratamento do TDM. Cerca de 50% a 60% dos indivíduos tratados não apresentam recuperação significativa dos sintomas depressivos, mesmo utilizando múltiplos medicamentos, caracterizando o transtorno depressivo resistente (TDR) (ZUSKY, 1988; FAVA, 2003). Diversos estudos sugerem a relação entre o quadro inflamatório do paciente à resistência ao tratamento com antidepressivos, uma vez que pacientes que possuem níveis de HDL baixo, hiperglicemia, hipertrigliceridemia e aumento da citocina IL-6 (uma das citocinas inflamatórias relacionadas ao comportamento suicida) possuem uma possibilidade menor de remissão dos sintomas depois de dois anos de tratamento com antidepressivos quando comparados às pessoas que não possuem essas alterações inflamatórias. (VOGELZANGS, N. et al., 2014; SOUSA, Rafael T., 2015) Sugere-se que os mecanismos que relacionam esse quadro à resistência aos antidepressivos se devem à característica das citocinas inflamatórias de interferirem nos níveis centrais de serotonina e triptofano, nas funções da microglia, em alterações no funcionamento do eixo HPA, redução na neuroplasticidade e/ou na ativação dos receptores de glutamato (ROSENBLAT, 2015).

Ainda que existam informações que levantem hipóteses sobre os mecanismos envolvidos com a resistência farmacológica na depressão, os dados apresentados na literatura são escassos e inconclusivos. Portanto, o objetivo desse estudo é construir uma rede de interações entre as proteínas, e identificar marcadores moleculares envolvidos com o TDR. Estes marcadores poderão ser utilizados como alvos para terapia farmacológica em estudos pré-clínicos com objetivo de encontrar novas possibilidades terapêuticas para pacientes resistentes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os marcadores moleculares envolvidos com o transtorno depressivo resistente através de abordagens *in silico*.

Objetivos específicos

- Elencar redes de interação proteína-proteína que estejam relacionadas com o TDR;
- Realizar o levantamento dos marcadores moleculares mais relevantes para o TDR;
- Analisar os resultados das hipóteses a partir dos dados da mineração de textos e da biologia de sistemas e inferir hipóteses experimentais a serem testadas em testes pré-clínicos.
- Avaliar os marcadores espécie-específico para construir o perfil molecular comum às espécies em relação ao TDR;
- Identificar diferenças no perfil molecular de cada espécie e relacioná-las ao TDR;

METODOLOGIA

Tipificação da pesquisa

Para cumprir os objetivos desse trabalho as etapas realizadas foram divididas da seguinte forma: Busca dos artigos na base de dados PubMed; triagem e curadoria manual dos artigos; seleção de proteínas a partir de uma revisão sistemática; construção da rede de interação proteína-proteína; análise das redes.

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura, utilizando um modelo de curadoria manual, que tem por objetivo reunir, avaliar criticamente e conduzir uma síntese dos resultados de múltiplos estudos primários. Respondendo, assim, uma questão previamente formulada, utilizando métodos sistemáticos para identificar, selecionar e avaliar os artigos relevantes, e coletar e analisar os dados destes estudos (CORDEIRO, 2007; COOK, 1967). Um dos desafios da realização de uma curadoria manual de alta qualidade da literatura científica é o volume do escopo constantemente crescente (WIEGERS, 2009).

Busca dos artigos

A primeira fase consistiu no planejamento da revisão sistemática da literatura (RSL), onde foi realizada uma busca inicial do tema proposto (Transtorno depressivo resistente) na literatura e orientações especializadas. Nesta etapa foram elaborados dois constructos, um relacionado aos modelos de estudo da depressão e outro do transtorno depressivo resistente (Quadro 01). Para a elaboração dos constructos foi utilizada a ferramenta MeSH do NCBI, onde foi possível identificar todos os termos relacionados ao tema.

CONSTRUCTO 1 Modelo de estudo da depressão	CONSTRUCTO 2 Transtorno Depressivo Resistente
Corticosterone model	Depressive Disorder Treatment Resistant
LPS model	Therapy-Resistant Depression
Social defeat model	Treatment Resistant Depression
Learned helplessness model	Refractory Depression
Genetic model	
Chronic unpredictable stress model	

Chronic variable stress model	
Maternal deprivation model	
Neonatal dexamethasone exposure model	
Rat model of depression	
Mice model of depression	

Quadro 01 – Definição dos constructos utilizados.

A busca dos artigos foi realizada na base de dados PubMed em 5 de março de 2021 utilizando a ferramenta de busca avançada, para isso foi utilizada a string query elaborada a partir dos constructos: “corticosterone model” OR “LPS model” OR “social defeat model” OR “learned helplessness model” OR “genetic model” OR “chronic unpredictable stress model” OR “chronic variable stress model” OR “maternal deprivation model” OR “neonatal dexamethasone exposure model” OR depressive disorder, major [MeSH Terms] OR "depressive disorder"[MeSH Terms]) OR “rat model of depression” OR “mice model of depression” OR “rodent model of depression AND Depressive Disorder Treatment Resistant” OR “Refractory Depression” OR “Therapy-Resistant Depression” OR “Treatment Resistant Depression” [MeSH Terms]”. A partir desta busca obteve-se 2156 resultados a serem triados.

Triagem e curadoria manual dos artigos

Para a triagem dos 2156 artigos referentes à *string* de busca utilizada inicialmente (Figura 03), foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: os termos pesquisados deviam aparecer no título, resumo ou corpo do texto; os títulos e resumos devem estar redigidos na língua inglesa; os artigos devem ter sido publicados entre os anos de 1978 até 2021, a busca foi finalizada em março/2021. Obtendo um total de 1831 artigos a partir dos critérios pré-estabelecidos, estes artigos tiveram seus títulos e resumos lidos pela curadoria. Neste processo foram excluídos do estudo os artigos que não abordavam o transtorno depressivo resistente e artigos que tratavam do transtorno depressivo bipolar, resultando em 1320 artigos para leitura na íntegra pela curadoria de forma manual. Para essa segunda etapa os critérios de exclusão utilizados foram os artigos não estarem na língua inglesa em sua íntegra, estudos clínicos, não abordar genes, proteínas ou moléculas relacionadas ao transtorno depressivo resistente. Dessa forma, foram selecionados para o estudo, de acordo com os critérios de inclusão, 315 artigos, dos quais foram coletados os seguintes dados descritos no Quadro 02.

Dado coletado	Descrição
Nome do gene	Nomenclatura de acordo com HGNC
Regulação do gene	Regulação para cima (<i>Up</i>) ou para baixo (<i>Down</i>)
Nível de ação	Ação sistêmica ou central
Região da ação central	Identificação da região de atuação
Modelo de estudo	Estudo em <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> ou <i>Homo sapiens</i>

Quadro 02 – Descrição dos dados coletados dos artigos estudados.

String de Busca

"corticosterone model" OR "LPS model" OR "social defeat model" OR "learned helplessness model" OR "genetic model" OR "chronic unpredictable stress model" OR "chronic variable stress model" OR "maternal deprivation model" OR "neonatal dexamethasone exposure model" OR "depressive disorder, major [MeSH Terms]" OR "depressive disorder [MeSH Terms]" OR "rat model of depression" OR "mice model of depression" OR "rodent model of depression AND Depressive Disorder Treatment Resistant" OR "Refractory Depression" OR "Therapy-Resistant Depression" OR "Treatment Resistant Depression" [MeSH Terms]"

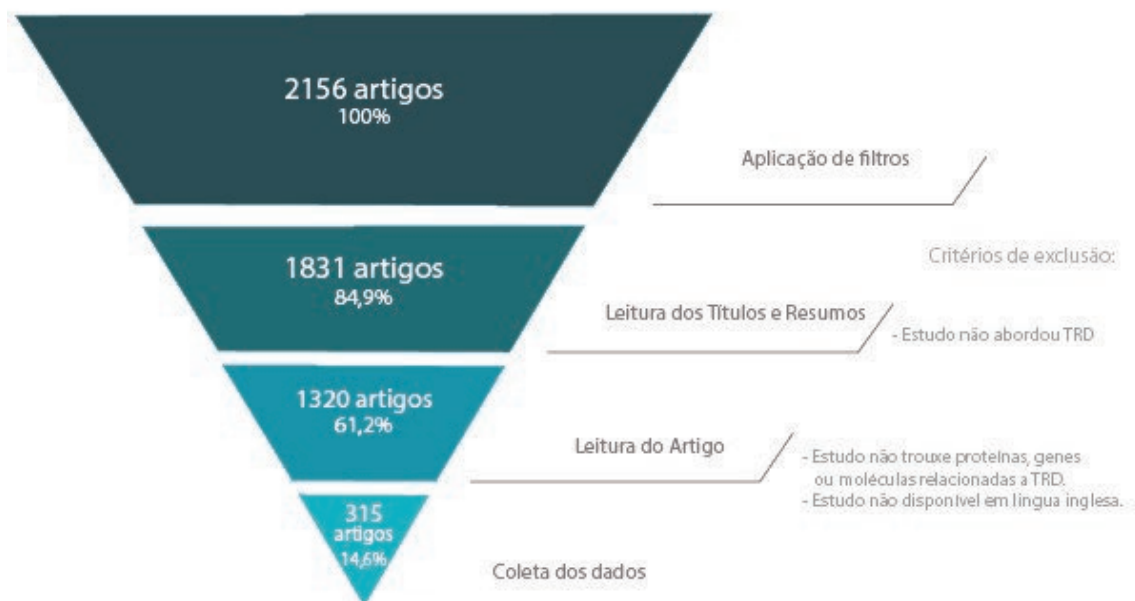


Figura 03 – Metodologia de seleção de artigo incluídos ou excluídos do estudo.

Seleção de proteínas

A partir dos dados coletados dos 315 artigos foi montado um quadro contendo todas as informações de cada proteína, gene ou molécula encontrada nos artigos (Figura 04).

Número do Artigo	ID	Nome Uniprot	Sigla	Nome	Tipo	Ação	Estrutura	Regulação	Regulação	Modelo	Organismo
51 P34969	HTR7	5-HT7	Receptor da Serotonina	Proteína	Central	Hipocampo	Up		1	Homo sapiens	Humano
51 P28221	HTR1D	5-HT1d	Receptor da Serotonina	Proteína	Central	Núcleo Dorsal da Rafe	Up		1	Homo sapiens	Humano
51 P28222	HTR1B	Htr1b	Receptor da Serotonina	Proteína	Central	Interneurônios GABAérgicos	Up		1	Homo sapiens	Humano
51 P08908	HTR1A	5-HT1a	Receptor da Serotonina	Proteína	Central	Hipocampo	Up		1	Homo sapiens	Humano
51 P08908	HTR1A	5-HT1a	Receptor da Serotonina	Proteína	Central	Córtex Pré-frontal	Up		1	Homo sapiens	Humano
51 P28223	HTR2A	5-HT2a	Receptor da Serotonina	Proteína	Central	Hipocampo	Up		1	Homo sapiens	Humano
51 P28223	HTR2A	5-HT2a	Receptor da Serotonina	Proteína	Central	Córtex Pré-frontal	Up		1	Homo sapiens	Humano
58 A2AIR5	Grin3a	NMDAR	N-methyl-D-aspartate Recept	Proteína	Central	Hipocampo	Up		1	Mus Musculi	Roedor
58 Q922W8	Gria4	AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl	Proteína	Central	Hipocampo	Down		0	Mus Musculi	Roedor
58 Q61616	Drd1	DRd1	Receptor de Dopamina D1	Proteína	Central	Córtex Pré-frontal Medial	Down		0	Mus Musculi	Roedor
58 P21237	BDNF	BDNF	Brain-derived Neurotrophic F	Proteína	Central	Córtex Pré-frontal	Down		0	Mus Musculi	Roedor
58 P21237	BDNF	BDNF	Brain-derived Neurotrophic F	Proteína	Central	Hipocampo	Down		0	Mus Musculi	Roedor
58 P15209	Ntrk2	TrkB	Tropomyosin Receptor Kinas	Proteína	Central	Córtex Pré-frontal	Down		0	Mus Musculi	Roedor
58 P15209	Ntrk2	TrkB	Tropomyosin Receptor Kinas	Proteína	Central	Hipocampo	Down		0	Mus Musculi	Roedor
58 Q9JLN9	Mtor	mTOR	Mechanistic Target of Rapam	Proteína	Central	Córtex Pré-frontal	Down		0	Mus Musculi	Roedor
58 Q9JLN9	Mtor	mTOR	Mechanistic Target of Rapam	Proteína	Central	Hipocampo	Down		0	Mus Musculi	Roedor
58 O88427	Cacna1h	T-type CC	T-type Calcium Channel	Proteína	Central	Habenua Lateral	Up		1	Mus Musculi	Roedor
58 P04202	Tgfb1	TGF- β 1	Transforming Growth Factor	Proteína	Central	Microglia	Down		0	Mus Musculi	Roedor
61 A2AIR5	Grin3a	NMDAR	N-methyl-D-aspartate Recept	Proteína	Central	Hipocampo	Up		1	Mus Musculi	Roedor
61 P19493	Gria4	AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl	Proteína	Central	Hipocampo	Down		0	Rattus norve	Roedor
65 P18280	Ntr3	NT-3	Neurotrofina 3	Proteína	Central	Córtex Pré-frontal	Down		0	Rattus Norve	Roedor
74 P01584	IL1B	IL- β	Interleukin β	Proteína	Sistêmica		Up		1	Homo sapiens	Humano
74 P05231	IL6	IL-6	Interleukin 6	Proteína	Sistêmica		Up		1	Homo sapiens	Humano
74 P01375	TNF	TNF- α	Tumor Necrosis Factor Alpha	Proteína	Sistêmica		Up		1	Homo sapiens	Humano
74 P22301	IL10	IL-10	Interleukin 10	Proteína	Sistêmica		Down		0	Homo sapiens	Humano

Figura 04 - Quadro parcial de dados das proteínas e genes relacionados a TDR

Após a elaboração do quadro com as proteínas e genes encontrados nos artigos, foi feita a busca de cada proteína no banco de dados Uniprot, adicionando ao quadro o ID e o nome codificado do mesmo. Dessa forma, todas as proteínas ou genes encontrados nos artigos foram identificados a partir do banco de dados.

Ainda, em caso de alguma informação faltante no quadro que impossibilite as análises, foi feita uma busca minuciosa nos artigos citados pelos autores como referência à proteína de interesse, para a identificação de tal informação. Dessa forma, para a complementariedade dos dados, os artigos secundários entram no estudo de modo referencial, e as proteínas que não possuíam todas as informações foram excluídas do estudo.

Construção da rede de interação proteína-proteína

Para o estudo foi utilizada a construção de grafos para identificar a interação entre proteínas. Os grafos são objetos matemáticos que permitem codificar relacionamentos entre pares de objetos através da abstração. A construção do grafo conta com os vértices sendo compostos pelas proteínas e as arestas a interação destas proteínas. Dessa forma podemos identificar a relação das proteínas encontradas nos estudos correlacionando com

o TDR (NETTO, 2006). Ainda, é possível identificar proteínas com maior nível de interação, formando centros de interação. Essas proteínas são chamadas de proteínas *Hub*, e dessa forma pode-se elucidar sua importância dentro das funções biológicas.

Portanto, após a coleta dos dados dos 315 artigos e a elaboração do quadro com as informações criou-se uma rede de interação proteína-proteína no software Cytoscape, utilizando a ferramenta *STRING protein query*. Por se tratar de um estudo translacional, esse processo foi realizado para cada um dos três organismos modelos encontrados: *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*. Foi usado uma pontuação de confiança 0,7 e uma quantidade máxima de 100 interatores.

Após a construção das redes de cada organismo, foi feita a subdivisão das mesmas, formando duas redes a partir de cada organismo, uma com as proteínas de ação sistêmica e outra com as proteínas de ação central. Observando as proteínas de ação central, duas regiões do cérebro foram evidenciadas nos dados, e a partir disso foi construído uma rede para cada região (Córtex pré-frontal e Hipocampo) Figura 05.

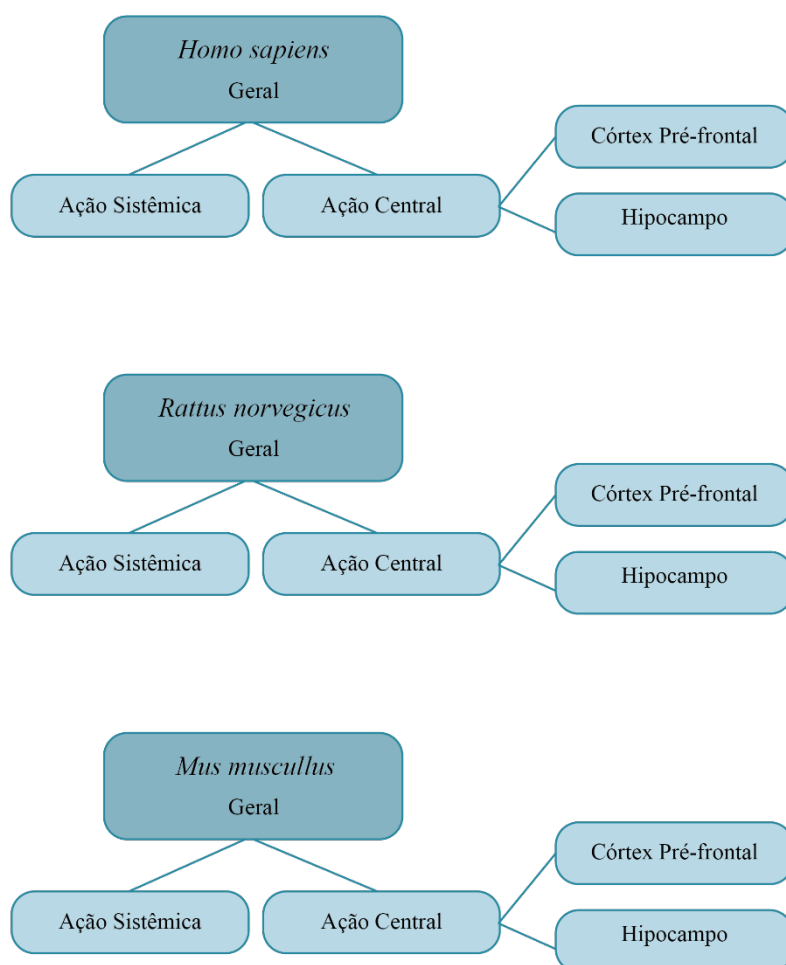


Figura 05 – Fluxograma da construção das redes

Na estilização da rede analisada foram utilizados tamanhos diferentes para os vértices. Os vértices maiores estavam relacionados às proteínas com maior número de citações nos artigos e vértices menores para proteínas pouco citadas. Ainda, as cores vermelho e verde dos vértices indica a regulação do gene. A cor vermelha indica uma regulação para baixo e a verde uma regulação para cima.

Cálculo de ponto de corte

Para a análise da rede de proteínas foi feito um ponto de corte. Identificou-se a mediana das citações, e para a rede de proteínas selecionadas utilizou-se apenas o quartil superior. Ainda, montou-se uma matriz onde em m (linhas) encontravam-se as proteínas e em n (colunas) as grandezas de Citações, *Betweenness Centrality*, *Degree* e *Closeness Centrality* obtidas através do software *Cytoscape*

Nas citações consta o número de aparições das proteínas estudadas nos artigos publicados. Já o *Betweenness Centrality* indica o grau de influência que uma proteína possui sobre as informações do grafo. O *Degree* demonstra o número de interações que a proteína possui com outros vértices, o que mostra a conectividade das proteínas no grafo. O *Closeness Centrality* apresenta a distância de uma proteína com os demais vértices, o que identifica a proximidade da proteína às outras presentes no grafo. A partir desses dados foi feito o cálculo do erro médio quadrático com a matriz construída. Para o estudo foram selecionadas as proteínas com distância $\geq 0,5$.

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Figura 06 – Fórmula do erro médio quadrático

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rede *Rattus norvegicus*

A partir da construção da rede de interação proteína-proteína nos três organismos estudados, observou-se proteínas presentes em vias que podem estar relacionadas com o TDR. Dessa forma cada rede foi analisada separadamente, tendo como resultado 36 proteínas para a rede *Rattus norvegicus*, sendo 12 reguladas para cima e 24 reguladas para baixo (Figura 07).

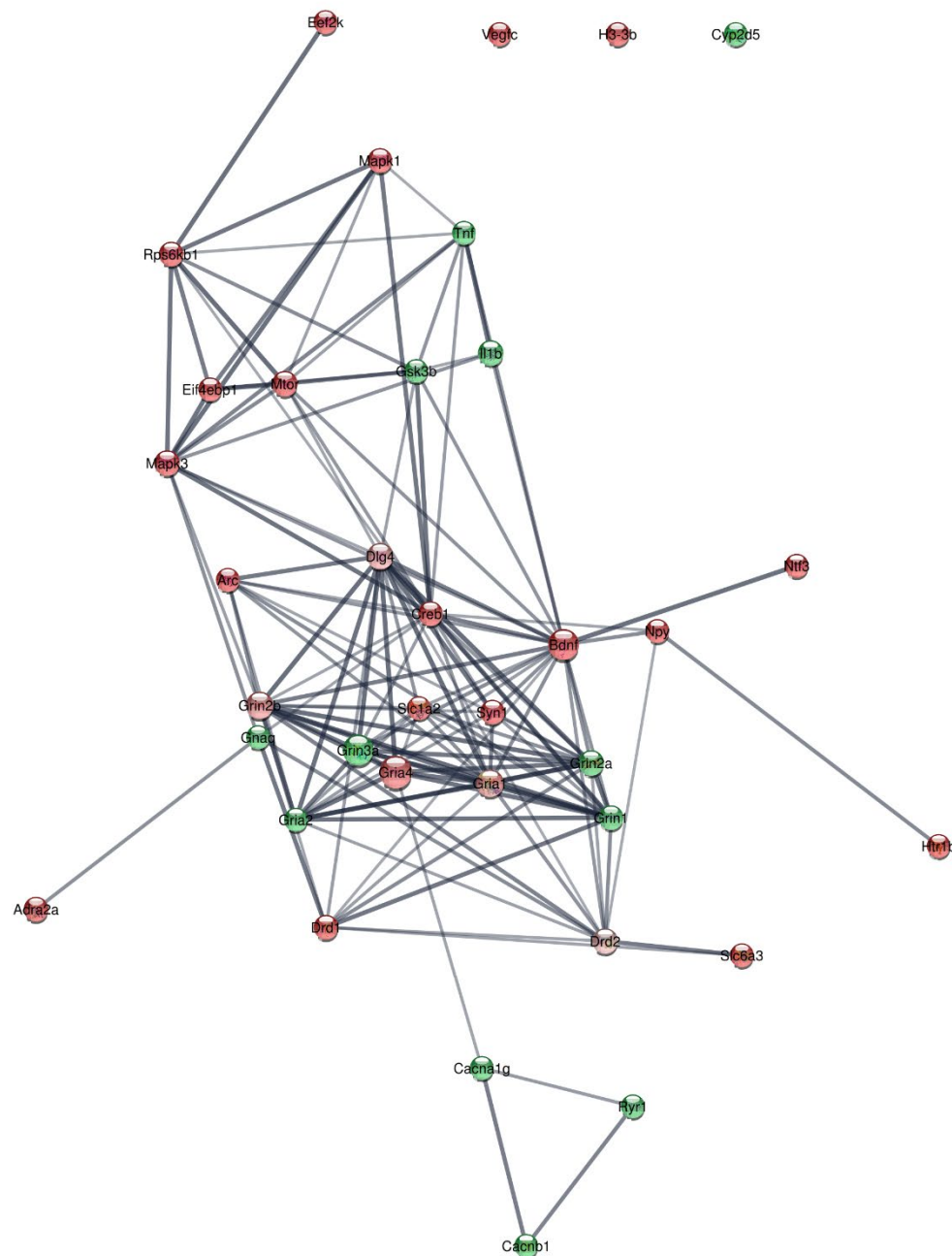


Figura 07 – Rede de interação proteína-proteína *Rattus norvegicus*

Utilizando a distância $\geq 0,5$ chegou-se ao número final de 10 proteínas, sendo 7 reguladas para baixo e 3 reguladas para cima (Figura 08). Dentre elas temos subunidades dos receptores de glutamato (Grin1, Grin2a, Grin2b, Gria1, Gria2, Gria4), fator de transcrição celular (CREB1), proteína kinase ativada por mitógeno (Mapk3) e fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF). As proteínas reguladas para cima encontradas no estudo foram o Grin1, Grin2a e Gria2, já as reguladas para baixo temos Mapk3, Dlg4, CREB1, BDNF, Gria1, Gria4 e Grin2b. Dessa forma, duas principais vias estão relacionadas a essas proteínas, a via da AKT/mTOR e a via relacionada aos receptores de glutamato.

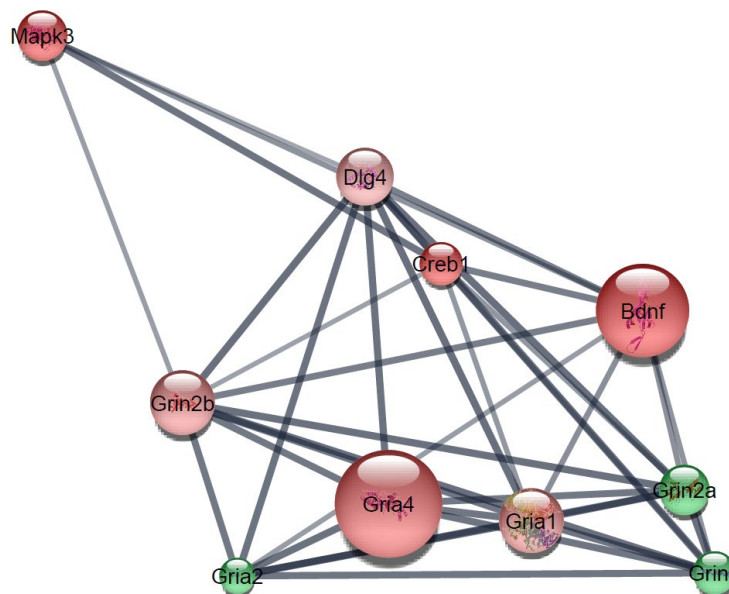


Figura 08 – Rede de proteínas selecionadas *Rattus norvegicus*

Possuímos três subtipos principais de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, eles são o AMPA, o cainato e o NMDA. Estes recebem sua nomenclatura de acordo com o tipo de agonista sintético que os ativam (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metilsoxazol-4-propiónico, cainato e N-metil-D-aspartato, respectivamente). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são excitatórios; o AMPA é ativado pela ligação do glutamato no receptor, dessa forma o Na^+ flui para a face intracelular da membrana do neurônio e o K^+ se desloca para o exterior, gerando uma despolarização no soma neuronal, o que caracteriza a atividade excitatória.

Quando ocorre a despolarização do soma e por conseguinte a ligação do glutamato no receptor NMDA, o canal da proteína é desobstruído, e isso aumenta a condutância da membrana ao Na⁺ e ao Ca⁺. É importante salientar que o cálcio apresenta funções celulares importantes, atuando na consolidação de memórias, aumentando a expressão de BDNF e facilitando o tráfego de neurotransmissores. Todavia, o excesso de Ca⁺ no soma neuronal é excitotóxico, uma vez que este pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, está envolvido com inflamação e com a apoptose. A Esketamina, antagonista do receptor NMDA, diminui sua condutância, e a inibição do NMDA, por sua vez, gera uma hiperexcitabilidade do AMPA, aumentando a expressão do BDNF e diminuindo a excitotoxicidade gerada pela hiperatividade do receptor NMDA. (PAPP *et al.*, 2020; KANDEL, 2014)

Dessa forma, nosso estudo demonstrou uma baixa expressão do receptor AMPA (Gria1 e Gria4) e uma alta expressão do receptor NMDA (Grin1 e Grin2a), correlacionando a excitação dos receptores NMDA por conta do estresse e a excitotoxicidade gerada pela ativação a longo prazo destes receptores no TDR.

A proteína AKT é responsável pela sinalização celular, para a sobrevivência e proliferação celular, a partir da fosforilação da proteína mTOR e da fosforilação da Mapk3 pela Ras. A partir desse sinal nota-se a ativação do fator de transcrição CREB, que aumenta a expressão do BDNF. O BDNF está relacionado a sobrevivência e plasticidade neuronal, assim como sua ausência está correlacionada com neurodegeneração e a presença de sintomas suicidas. (JAKUSZKOWIAK-WOJTEN *et al.*, 2019; KANDEL, 2014).

Assim, na rede de proteínas construída em nosso estudo, a baixa expressão da Akt3, Mapk3 e BDNF justifica a correlação da apoptose de células neuronais e baixa plasticidade com o TDR.

Rede *Mus musculus*

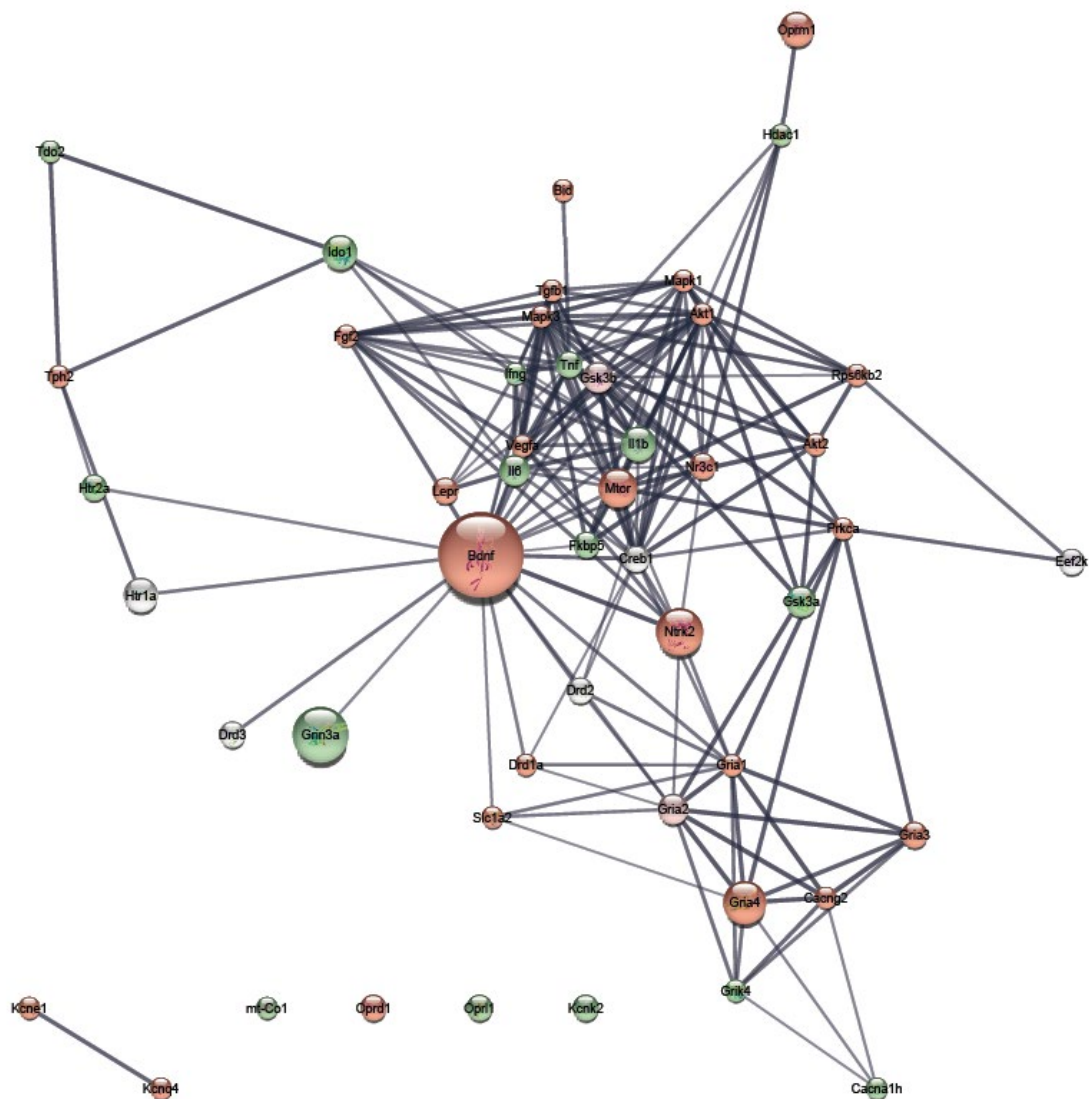


Figura 09 - Rede de interação proteína-proteína *Mus musculus*

A rede obtida a partir das proteínas em modelo *Mus musculus* possui 49 proteínas (16 reguladas para cima e 23 reguladas para baixo) (Figura 09). Utilizando a seleção de proteínas apenas com distâncias $\geq 0,5$ atingiu-se uma rede formada por 14 proteínas. Sendo estas 4 reguladas para cima, dentre elas alguns marcadores inflamatórios; e 9 reguladas para baixo, relacionadas aos receptores de glutamato (Gria1 e Gria4), sinalização da transcrição celular para sobrevivência e proliferação (AKT, mTOR e Gsk3b), proteína kinase ativada por mitógeno (Mapk1 e Mapk3) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Figura 10).

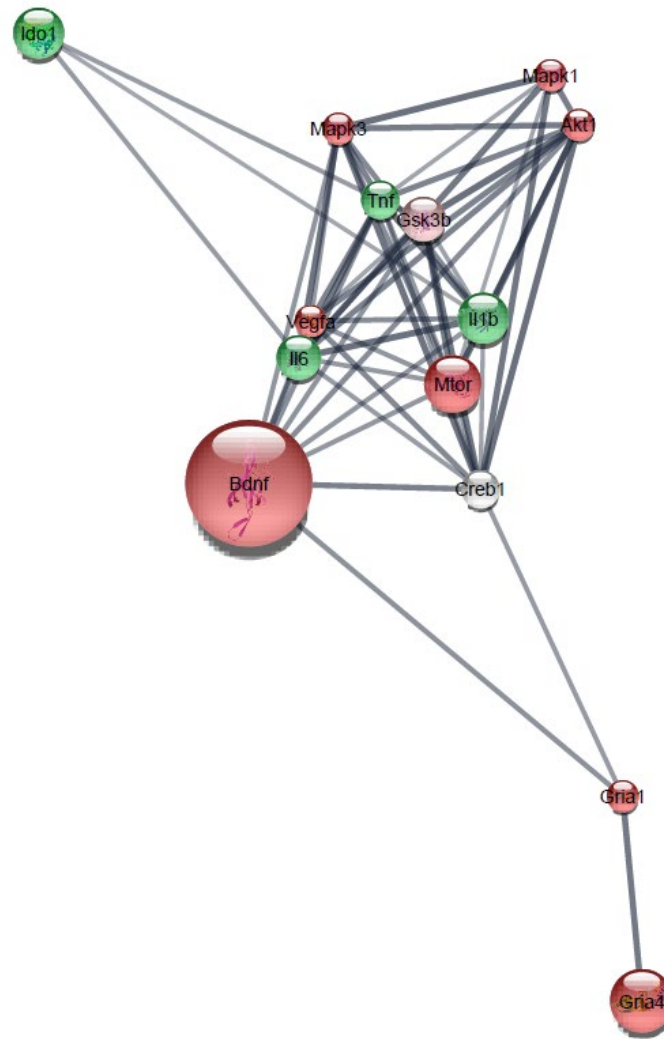


Figura 10 - Rede de interação de proteínas selecionadas *Mus musculus*.

Assim como no modelo animal *Rattus norvegicus* as vias relacionadas as proteínas encontradas na rede são da via da AKT/mTOR e aos receptores de glutamato. Também, podemos identificar marcadores inflamatórios, que ao apresentarem-se regulados para cima podemos considerar um fortalecimento do perfil inflamatório.

Estudos demonstram que o estresse crônico pode desencadear a dessensibilização do eixo HPA, aumentando os níveis de cortisol. Altos níveis de cortisol estão envolvidos com uma resposta pró-inflamatória, ativando interleucinas pró-inflamatórias. Por conta do perfil inflamatório crescente nesse modelo, a barreira hematoencefálica se torna permeável, permitindo a migração de monócito, linfócitos, macrófagos e outras células do sistema imune da corrente sanguínea para o sistema nervoso central. (KIM, et al. 2014; YANG et al., 2019; KANDEL, 2014)

Dessa forma o perfil inflamatório do sistema nervoso central gera alterações da expressão dos receptores de glutamato e de serotonina e leva a inibição da via AKT/mTOR. Essas variações estão relacionadas às características do comportamento depressivo e à resistência farmacológica na depressão. (KIM, et al. 2014; YANG *et al.*, 2019).

Portanto, a expressão regulada para cima de proteínas inflamatórias nesta rede do estudo pode caracterizar a relação íntima da inflamação com o transtorno depressivo resistente.

Rede *Homo sapiens*

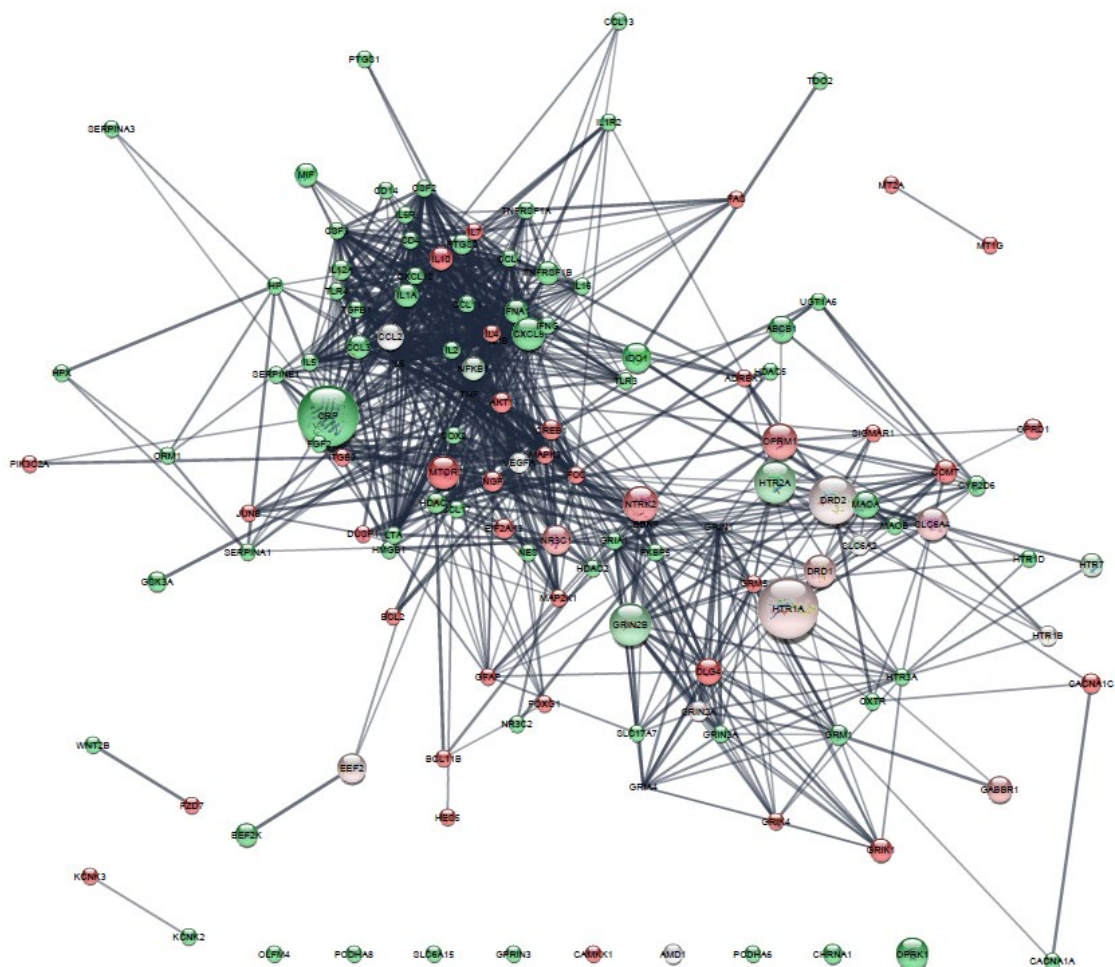


Figura 11 – Rede de interação proteína-proteína em *Homo sapiens*

Ao formar a rede para a espécie *Homo sapiens* foram encontradas 131 proteínas relacionadas ao TDR (Figura 11). Dessa forma, foram selecionadas apenas as proteínas com distâncias $\geq 0,5$, resultando em uma rede formada por 43 proteínas. Destas 13 proteínas encontram-se reguladas para baixo e 15 reguladas para cima (Figura 12).

Nesta espécie encontramos proteínas relacionadas a cinco vias principais, sendo elas a via da AKT/mTOR, inflamação e expressão de receptores de glutamato, serotonina e opióides.

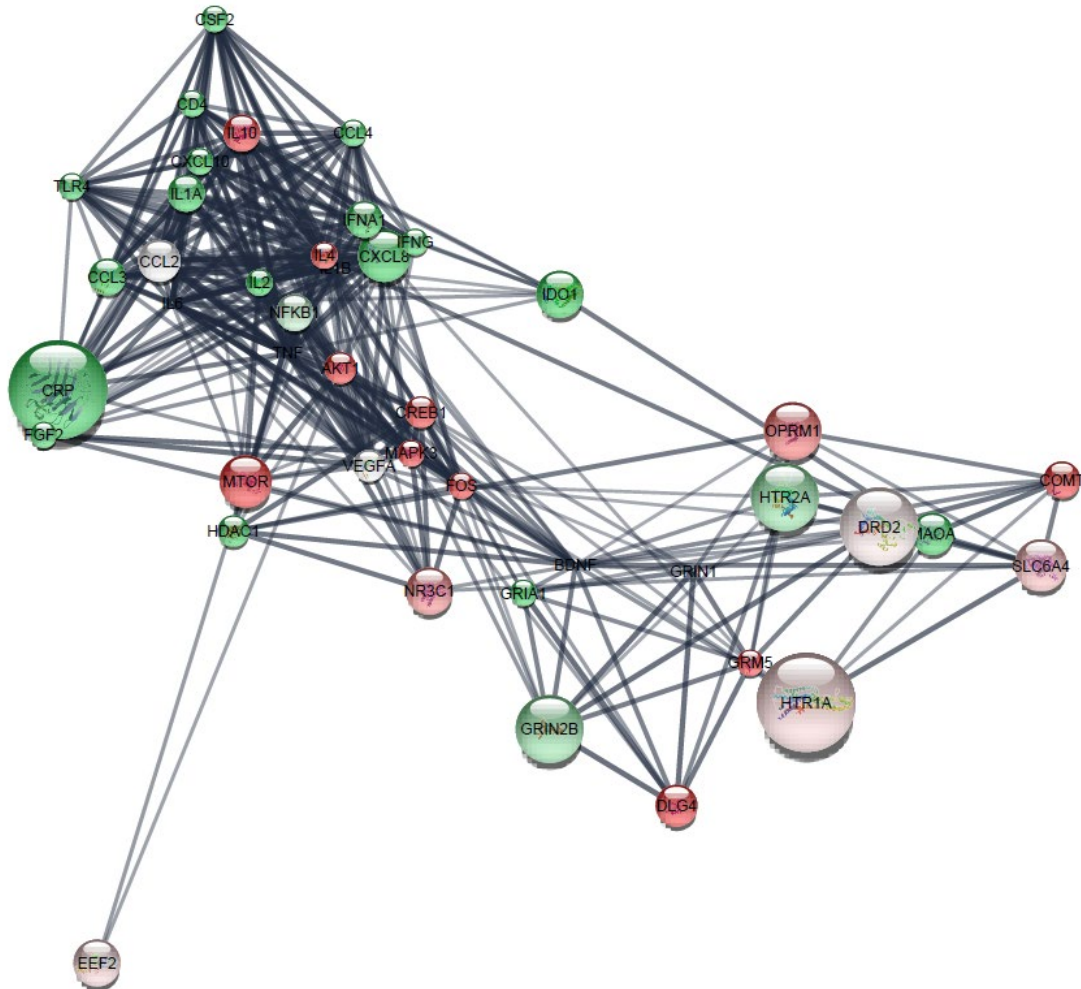


Figura 12 – Rede de proteínas selecionadas para *Homo sapiens*.

Da mesma forma que encontrada na rede da espécie *Mus musculus*, o perfil inflamatório demonstrado pela expressão de proteínas inflamatórias como o TNF, proteína C reativa (PCR), IL1a, IL2 e CD4, influencia negativamente a via da AKT/mTOR. Isso pode estar correlacionado com a regulação para baixo das proteínas AKT, mTOR, CREB e Mapk3, todas envolvidas com a sinalização celular para a sobrevivência e proliferação celular. Ainda, a inflamação altera a expressão de receptores ionotrópicos como NMDA (*up regulation*) e AMPA (*down regulation*), podendo provocar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e excitotoxicidade.

Além disso, existem algumas controvérsias em relação a regulação dos receptores serotoninérgicos e opioides. Alguns estudos demonstram que a regulação para cima do receptor de serotonina (5-HT_{2a}) possui relação com a baixa biodisponibilidade de serotonina na fenda sináptica, por conta da sua hiperatividade. Dessa forma, a resistência farmacológica aos antidepressivos pode estar relacionada ao aumento na expressão desse receptor (MATHYS; MITCHELL, 2011; MORRIS ET AL., 2015).

Os receptores opioides possuem resposta excitatória, uma vez que o opioide se liga ao receptor ocorre a abertura do canal de cálcio liberando neurotransmissores, dentre eles a 5-HT, NA e DA. Visto que no estudo o receptor opioide (OPMR1) encontra-se regulado para baixo, a resposta excitatória dos neurotransmissores é atenuada, possuindo correlação com os sintomas depressivos (MATHYS; MITCHELL, 2011; MILLER; MORAN; HALL, 2016).

Intersecção das redes

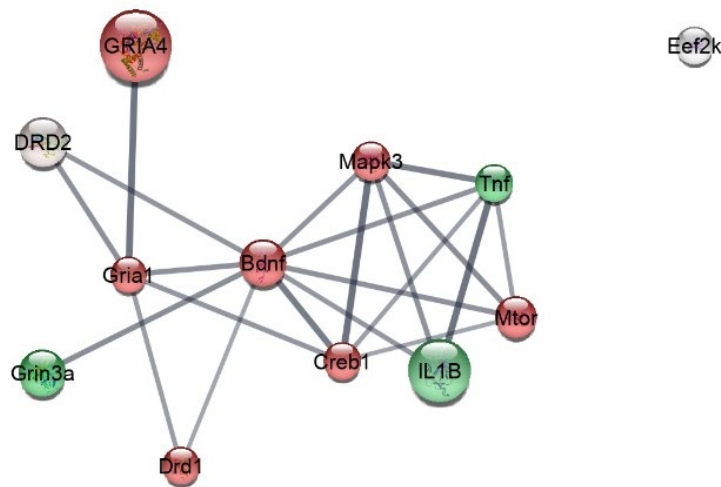


Figura 13 – Intersecção das redes dos modelos de depressão.

Na rede de intersecção das espécies estudadas pode-se encontrar três vias em comum, sendo elas a via AKT/MTOR; a via relacionada às subunidades dos receptores de glutamato (NMDA e AMPA); e proteínas relacionadas à hipótese inflamatória. Esses marcadores são candidatos a alvos de estudos para resistência farmacológica aos antidepressivos. Observa-se uma quantidade maior de proteínas inibidas do que reguladas para cima na intersecção das redes, assim como uma predominância em proteínas

periféricas, por conta dos estudos clínicos em humanos serem limitados quanto aos marcadores centrais.

A partir das análises feitas por região do encéfalo, obteve-se resultados significativos nas regiões do córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos, ratos e humanos. Essas regiões são responsáveis pelo controle cognitivo, executivo e emocional do comportamento e controle de comportamentos motivados específicos e estado de alerta (KANDEL, 2014).

Em camundongos observou-se o receptor NMDA regulado para cima e o receptor AMPA regulado para baixo no córtex pré-frontal (Figura 14). Estudos demonstram efeitos antidepressivos quando fármacos agem diretamente ativando os receptores AMPA e inibindo os receptores NMDA na região do córtex pré-frontal de camundongos (AUTRY et al., 2011; YANG et al., 2015). Ainda, destaca-se a proteína GSK3b regulada para baixo, esse sinal é a chave para desencadear a cascata de morte celular, relacionada com os sintomas depressivos (MISKOWIAK, 2014).

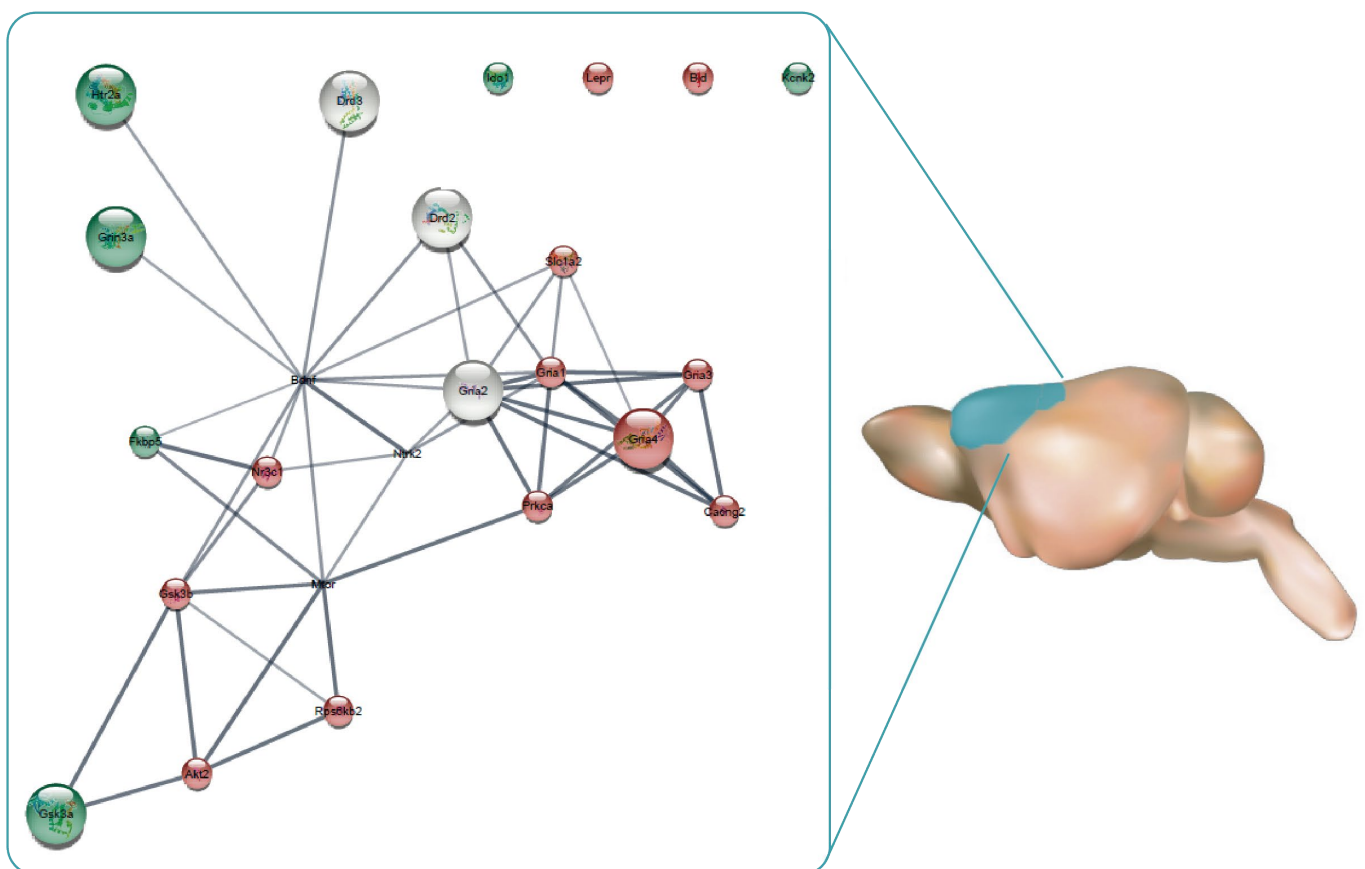
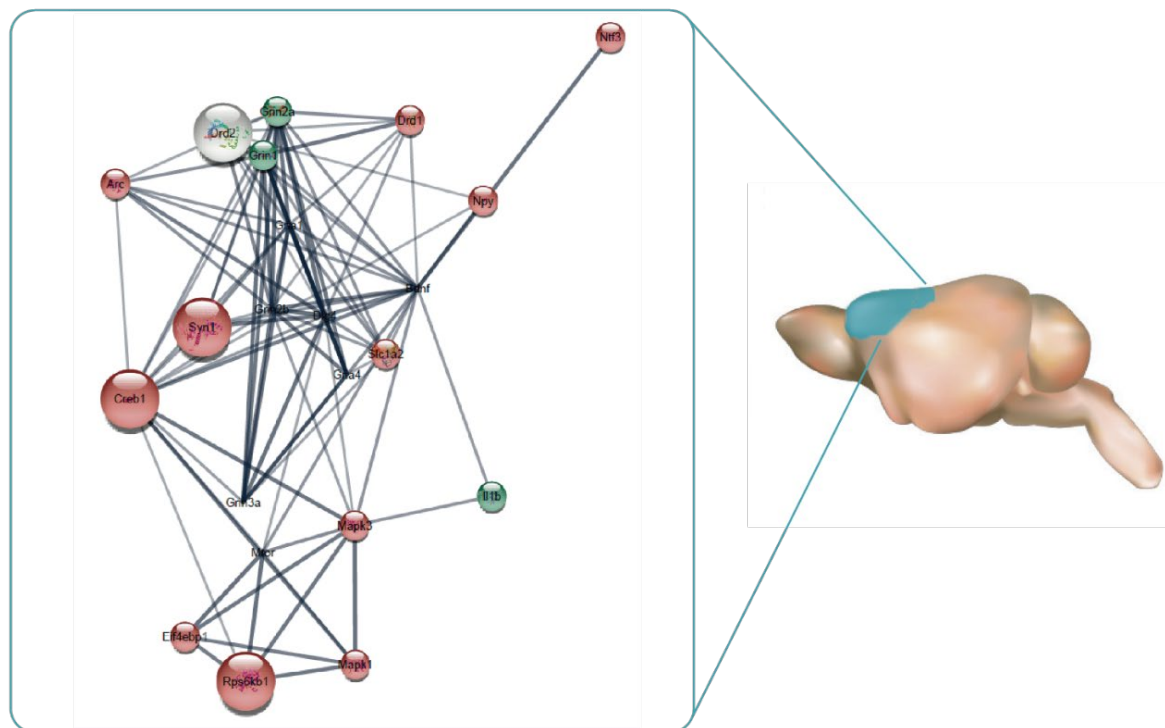


Figura 14 – Rede de proteínas com ação no córtex pré-frontal de camundongo

Da mesma forma, o receptor NMDA (*Grin1*) em ratos está regulado para baixo (figura 15), assim como o receptor de dopamina (*Drd1*). O estresse gera desregulação tanto no metabolismo da dopamina, quanto na transcrição dos receptores de dopamina, gerando uma diminuição na síntese de receptores e diminuindo assim a densidade de receptores de dopamina na região do córtex pré-frontal (ZHANG et al, 2015). Além disso, as proteínas *Creb1*, *BDNF* e *Arc* apresentam-se reguladas para baixo. Uma vez que o metabolismo do CREB está ligado a ativação do BDNF, resultando em proliferação celular e sobrevivência neuronal, e a proteína *Arc* regula a plasticidade sináptica, a inibição destas acarreta em uma das principais consequências do TDM, a morte celular (MURCK, 2013; PASTUZY, 2018). Outras proteínas alteradas no córtex pré-frontal de ratos são a *Mapk1* e a *IL1b*. A *Mapk1* está relacionada a plasticidade neural e regulação dos processos anti-inflamatórios. Uma vez que esta proteína está regulada para baixo, notamos uma diminuição na plasticidade e um aumento da sinalização para reações inflamatórias, que pode ser validada pela regulação para cima da interleucina 1b (*IL1b*) (CALATI et al, 2013).



com a proliferação neural e plasticidade, portanto, uma vez que se encontra regulada para baixo, essas funções são prejudicadas, aumentando o potencial neurodegenerativo (HANIU, 1995; YEO, 2004). Da mesma forma, o Creb1 encontra-se regulado para baixo.

O CREB é uma importante proteína que está diretamente correlacionada com a sobrevivência celular do sistema nervoso central, de forma que é na cascata metabólica do CREB que ocorre a ativação do BDNF (MURCK, 2013; PASTUZY, 2018). Além disso, podemos observar o receptor de serotonina (HTR7) regulado para baixo, o que mostra a diminuição da atividade serotoninérgica, pois o receptor HTR7 está acoplado a uma proteína G excitatória que ao ser estimulada pelo 5-HT age promovendo potenciais excitatórios pós sinápticos (VADODARIA, 2018).

Ainda, encontrou-se duas proteínas reguladas para cima, o NMDA (Grim1), e a MAO (monoamina oxidase). Na região estudada as principais monoaminas encontradas são neurotransmissores (NA, DA e 5-HT), que ao passarem pelo processo oxidativo são degradados na fenda sináptica (PITON, 2014; SON, 2008;).

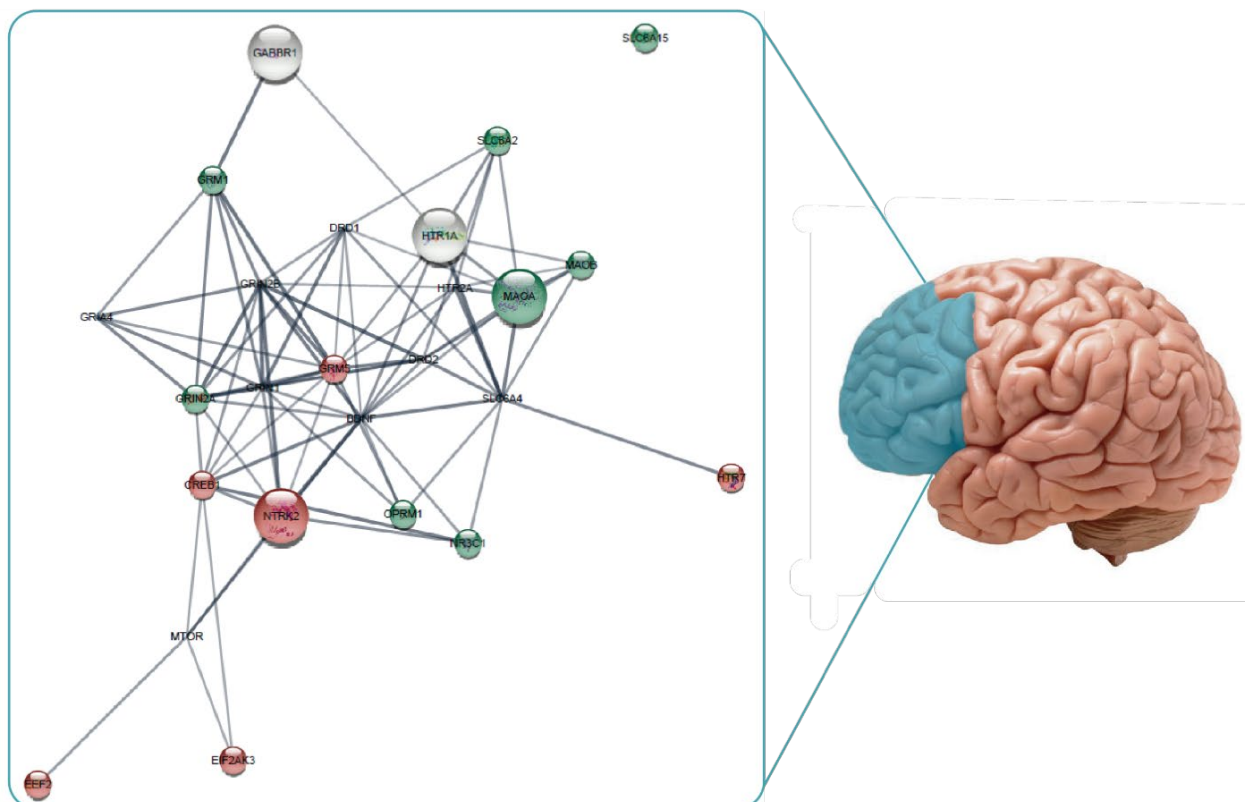


Figura 16 – Rede de interação proteína-proteína no córtex pré-frontal humano

Dessa forma podemos inferir através dos resultados dos três modelos na região do córtex pré-frontal que há uma hipoatividade dessa região no TDR, uma vez que

encontramos proteínas que diminuem a concentração de neurotransmissores, ou os degradam, além de outras proteínas relacionadas a morte neural, diminuindo a proliferação celular e plasticidade neuronal.

Outra região cerebral que se destacou na análise foi o hipocampo. O hipocampo atua diretamente sobre os eventos corticais envolvidos com a memória e aprendizagem. Estudos demonstram a fragilidade do hipocampo em relação à estímulos, uma vez que é afetado em diversas doenças e transtornos (ANAND, 1995).

Em camundongos, a rede (Imagem 17) evidencia algumas proteínas reguladas para baixo que estão relacionadas à sobrevivência celular e plasticidade neural, entre elas AKT (AKT1 e AKT2), mTOR, Mapk (Mapk1, Mapk2 e Mapk3) e AMPA (Gria2, Gria3 e Gria4) (GUO, 2014; WEI, 2020). A AKT, mTOR e Mapk estão ligadas a vias de sinalização relacionados ao crescimento neuronal, e o receptor AMPA estimula a sinalização para o BDNF (KAVALALI, 2020; JAKUSZKOWIAK-WOJTEN, 2019; FORNARO, 2019). Outras proteínas que aparecem reguladas para cima são aIDO e o TNF. A proteína IDO tem como função a conversão do triptofano em kynurenina. Dessa forma, como a IDO apresenta regulação para cima, nota-se um aumento na concentração de kynurenina, gerando neurotoxicidade (VAN BAREM, 2015). Já o TNF possui atividade necrótica, levando neurônios a morte celular, além de participar de reações inflamatórias. Assim, com sua regulação para cima, nota-se um maior estímulo para perda de volume neural (FENG, 2019).

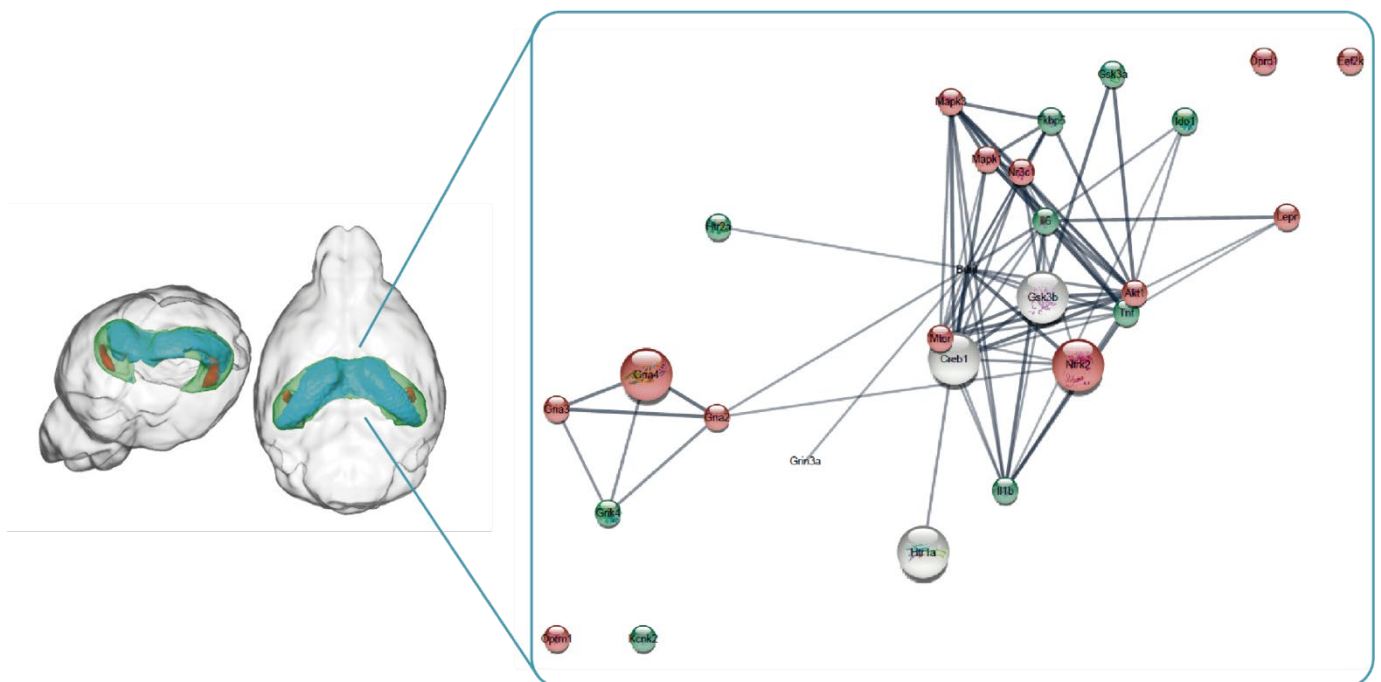


Figura 17- Rede de interação proteína-proteína no hipocampo em camundongos

Na rede de interação do hipocampo nos ratos (Figura 18) também encontramos a proteína Mapk regulada para baixo. Além dela destaca-se a proteína CREB também regulada para baixo. Uma vez que ela participa da via mTOR, sua regulação irá influenciar a proliferação dos neurônios e plasticidade da região, da mesma forma que o AMPA (gria2, 3 e 4) regulado para baixo irá contribuir com o mesmo efeito (GUO, 2014; WEI, 2020). Já proteínas como a IDO1 e TNF estão presentes mais uma vez com sua regulação para cima, podendo estar relacionadas com a morte celular e neurotoxicidade (VAN BAREM, 2015; FENG, 2019) Ainda, nota-se proteínas pró-inflamatórias como a IL6 e a IL1b reguladas para cima, o que corrobora como os estudos que correlacionam a neuro inflamação com o TDR (MILLER, 2008).

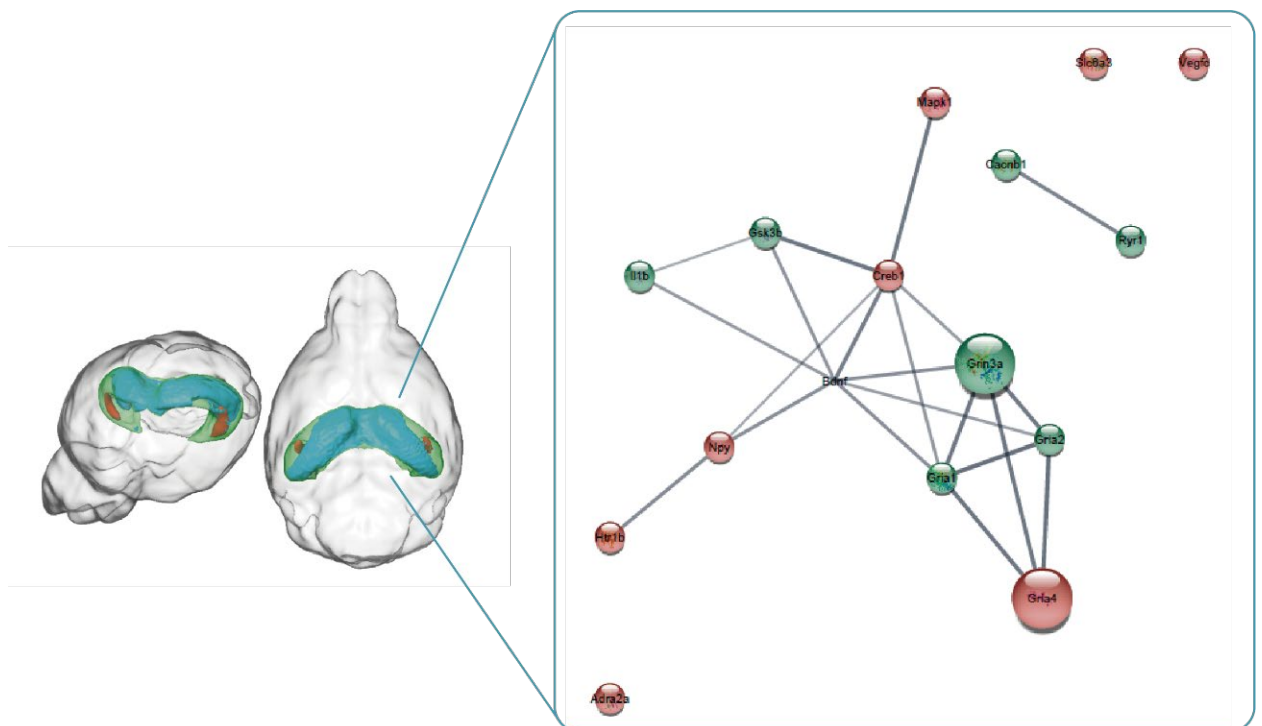


Figura 18 – Rede de interação proteína-proteína no hipocampo de ratos.

Na rede do hipocampo em humanos (Imagem 19) podemos evidenciar algumas proteínas já citadas nos outros organismos como a AKT1, mTOR, CREB e AMPA (Gria4), todas reguladas para baixo, possuindo como efeito principal a diminuição da proliferação e plasticidade neural. Encontramos novamente o TNF, interleucinas pró-inflamatórias (IL1b e IL5) e o receptor NMDA regulados para cima, tendo relação como direta com a inflamação, morte celular e estresse oxidativo.

Além dessas proteínas podemos salientar algumas que não estavam presentes nos outros organismos estudados, tal como os receptores opioides (OPRD1 e CPRM1), FAS e NTRK2. Os receptores opioides possuem resposta excitatória quando ativados, abrindo

Dessa forma podemos agrupar os principais resultados das diferentes expressões de proteínas encontradas nas redes de interação (Quadro 03).

<i>Mus musculus</i>		<i>Rattus norvegicus</i>		<i>Homo sapiens</i>	
Córtex Pré-frontal	Hipocampo	Córtex Pré-frontal	Hipocampo	Córtex Pré-frontal	Hipocampo
Gria4 ↓	Gria4 ↓	Grin1 ↑	Gria4 ↓	MAOa ↑	Grin2b ↑
Grin3a ↑	Mtor ↓	Grin2 ↑	Grin3a ↑	NTRK2 ↓	HT2a ↑
Gsk3a ↑	Akt ↓	Il1b ↑	Gsk3b ↑	Creb1 ↓	Mtor ↓
Ido1 ↑	Nrk2 ↓	Mapk1 ↓	Il1b ↑	OPRM1 ↑	OPRM1 ↓
	Tnf ↑	Creb1 ↓	Mapk1 ↓		IL1b ↑
	Il6 ↑	Drd1 ↓	Creb1 ↓		AKT1 ↓
	Ido1 ↑				Creb1 ↓
	Gsk3b ↑				TNF ↑

Quadro 03 – Resumo dos resultados

Com isso, podemos observar que as proteínas relacionadas às subunidades do receptor de glutamato AMPA (Gria4), proteínas relacionadas com sobrevivência e plasticidade neuronal (BDNF e Mapk1) e proteínas relacionadas à transcrição do BDNF (AKT1, mTOR e Creb1) estão reguladas para baixo. Enquanto, proteínas relacionadas às subunidades do receptor de glutamato NMDA (Grin1, Grin2, Grin2b e Grin3a), proteínas relacionadas a sinalização de morte celular e necrose (Gsk3a, Gsk3b e TNF), Proteína relacionada a conversão de triptofano em quinurenina (Ido1) e interleucinas pró inflamatórias (Il1b e Il6) estão reguladas para cima, demonstrando o efeito neuro tóxico, degenerativo e inflamatório presente no TDR.

CONCLUSÃO

Conclui-se com o estudo uma relação de cinco principais vias que envolvem as proteínas encontradas nos estudos. Marcadores envolvidos na hipótese inflamatória, proteínas participantes da via da AKT/mTOR e a via relacionada às subunidades dos receptores de glutamato foram identificados nas três espécies estudadas. Além dessas, encontrou-se proteínas importantes correlacionadas aos receptores serotoninérgicos e opioides em humanos.

PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Acredita-se que os marcadores encontrados poderão ser utilizados como alvos teste para terapia farmacológica em estudos pré-clínicos com objetivo de encontrar novas possibilidades terapêuticas e remanejamento farmacológico para pacientes resistentes. Ainda, objetiva-se criar um banco de moléculas, com as informações encontradas na revisão sistemática.

APÊNDICE

Artigo submetido na revista *Psychoneuroimmunology Journal*.

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS IN TREATMENT-RESISTANT DEPRESSION USING IN SILICO ANALYSIS

Mayara T. Moreira¹, Vitor S. Frank¹, Ellen Scotton^{2,3}, Eduardo E. dos Reis¹, Helena Marca¹, Laura M. Goldfeld¹, Vitória Chen¹, Letícia Casagrande¹ e Jennifer C. Santos¹, Scheila A. e Silva⁴, Rafael Colombo¹

¹Biotechnology Institute, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Laboratory of Molecular Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

³Pharmacology Department and Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Computational Biology and Bioinformatics Laboratory, Exact Sciences and Engeneering Departament, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

Corresponding author affiliation:

Rafael Colombo, Ph.D.

Biotechnology Institute – UCS

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130.

CEP 95070-560 - Caxias do Sul – RS – Brasil

Email: rcolombo1@ucs.br

Telephone: 552151 991348476

ABSTRACT

Major depressive disorder is a disease that affects about 320 million people worldwide, and about 50% of these individuals do not respond adequately to first-line drugs. However, we still do not know the molecular markers involved in the failure of pharmacological response. Thus, we used *in silico* analyses in three organisms to help identify this. Therefore, protein-protein interaction networks were constructed for each model organism of the proteins in the systematic literature review. With this, we arrived at genes believed to be related to drug resistance, and these are involved in the AKT-mTOR, serotonergic receptor subunit, and inflammatory hypothesis pathways.

KEYWORDS

Treatment-resistant major depressive disorder, bioinformatics, inflammatory hypothesis, BDNF, glutamate receptors, neurotoxicity.

INTRODUCTION

Major depressive disorder (MDD) is a recurrent and disabling mental disorder that affects more than 320 million people worldwide. The disorder is characterized by episodes of depressed mood and loss of interest or pleasure in almost all activities throughout at least two weeks [1]. Also, worsening depressive symptoms can lead to critical circumstances such as suicide [1,2]. Treatment for depression is carried out by drug therapy, psychotherapy, or alternative methods such as electromagnetic prefrontal cortex stimulation. However, even though drugs have different mechanisms of action, about 50% to 60% of treated individuals do not recover significantly from depressive symptoms, even after multiple medications. Patients who do not respond to multiple treatment attempts are diagnosed with treatment-resistant depression (TRD) [3,4].

Due to the significant number of patients with treatment-resistant depression, research on strategies and alternatives for treating these patients acquires fundamental relevance [5]. Even though there is information that hypothesizes the mechanisms involved with MDD and pharmacological resistance in depression, the data presented in the literature is scarce and inconclusive. MDD is the result of environmental, physiological, and genetic factors. Among the genetic mechanisms associated with MDD are histone acetylation or deacetylation, DNA mutations, DNA methylation, hydroxymethylation, and the mechanisms of non-coding RNAs [6]. Furthermore, evidence strengthens the correlation between inflammation and depression [6,7]. Under stressful circumstances, the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis is activated, increasing cortisol levels. Studies show that this long-term increase in cortisol leads to increased β -adrenergic receptor sensitivity and pro-inflammatory cytokine expression, such as IL-2, IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor (TNF) concentration. Elevated production of pro-inflammatory cytokines is positively related to depressive symptoms and suicidal behavior [8,9,10].

Furthermore, serotonin synthesis can be reduced by increased cortisol concentrations. With high cortisol levels, the tryptophan hydroxylase enzyme is inhibited, and thus, tryptophan can be converted into kynurenine, a neurotoxic molecule. In addition, higher cortisol levels also promote a decrease in messenger RNAs (mRNAs) that encode serotonin receptors, resulting in a lower expression of these receptors, decreasing serotonin signaling in several cortical regions [11,12]. Thus, these events reduce serotonin levels and lower action on its receptors, intensifying the negative symptoms related to MDD.

Several studies relate an inflammatory state with TRD since patients who have increased levels of specific cytokines, such as IL-6, have a lower possibility of symptom remission after two years of treatment with antidepressants [10,13]. It is suggested that the failure to respond to antidepressant pharmacological treatment is related to the increase in inflammatory cytokines, reduction in central serotonin and tryptophan levels, impairment of microglia functions, changes in HPA axis functioning, reduction in neuroplasticity, and excitotoxic activation of glutamate receptors [14].

Although there is information that hypothesizes the mechanisms involved in pharmacological resistance in depression, the data presented in the literature is scarce and inconclusive. Therefore, this study aims to build a network of protein interactions and identify molecular markers involved with TRD. These markers could potentially be

targets for pharmacological therapy in preclinical studies aiming to find new therapeutic possibilities for resistant patients.

METHODOLOGY

Typification of research

To fulfill the objectives of this paper, we divided the steps performed as follows: Search for the articles in the PubMed database; manual screening and curation of the articles; protein selection through a systematic review; construction of the protein-protein interaction networks; analysis of the networks.

We systematically reviewed the literature using a manual curation model, which aims to gather, critically evaluate, and synthesize the results of multiple original studies [15,16].

Article Search

The first phase consisted of planning the systematic literature review (SLR), where we conducted an initial search for the proposed theme in the literature (Treatment Resistant Depression). In this step, we developed two constructs, one related to the animal models of depression and the other to treatment-resistant depression (Figure 1). To develop these constructs, we used the NCBI MeSH tool, where it was possible to identify all terms related to the theme.

We searched the PubMed database for articles using the advanced search tool. For this, the following string query was developed from the constructs: “corticosterone model” OR “LPS model” OR “social defeat model” OR “learned helplessness model” OR “genetic model” OR “chronic unpredictable stress model” OR “chronic variable stress model” OR “maternal deprivation model” OR “neonatal dexamethasone exposure model” OR depressive disorder, major [MeSH Terms] OR "depressive disorder"[MeSH Terms]) OR “rat model of depression” OR “mice model of depression” OR “rodent model of depression AND Depressive Disorder Treatment-Resistant” OR “Refractory Depression” OR “Therapy-Resistant Depression” OR “Treatment Resistant Depression” [MeSH Terms]”. From this search, we obtained 2156 results to be screened.

Manual sorting and curation of the articles

To screen the 2156 articles obtained from the initial search string, we used the following inclusion criteria: MeSH terms present in the title, abstract, or body text; Article title and abstract written in English; articles published between 1978 and 2021. As a result, we obtained 1831 articles from the pre-established criteria, and these articles had their titles and abstracts read by the curators. In this process, we excluded from the study the articles that did not address treatment-resistant depression and that dealt with bipolar depressive disorder, resulting in 1320 articles being read in full by the curators. For this second step, the exclusion criteria were: articles not written in full in English, clinical studies, and articles that did not address the study of genes, proteins, or molecules related

to resistant depressive disorder. Thus, according to the inclusion criteria, we selected 315 articles from which the following data described in Figure 2 was collected.

Protein selection

From the data collected from 315 articles, we made a table containing all the information on each protein, gene, or molecule found in the articles. After preparing the table with proteins and genes found in the articles, we searched for each protein in the Uniprot database, adding the ID and its code name. In this way, all the proteins or genes found in the articles were identified from the database.

Also, in case of missing information that would make the analyses unattainable, we thoroughly searched the cited reference articles to identify missed information. Thus, to complement the data, the secondary articles entered the study in a referential way, and the proteins that did not have all the information were excluded from the study.

Building the protein-protein interaction network

We use graph construction to identify the interaction between proteins. The graph comprises the nodes being proteins and edges representing the interaction between these proteins. In this way, we can identify the relation of the proteins found in the studies correlating with the TRD [17]. Furthermore, identifying proteins with higher levels of interaction is also possible, forming interaction centers. These proteins are called Hub proteins; thus, one can elucidate their importance within biological functions.

Therefore, after collecting the data from 315 articles and elaborating a table with the information, we created a protein-protein interaction network in the Cytoscape software, using the STRING protein query tool, for each of the three model organisms found: *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, and *Mus musculus*. We used a confidence score of 0.7 and a maximum amount of 100 interactors.

After building the networks for each organism, we subdivided them, forming two networks from each organism, one with the systemic action proteins and another with the central action proteins. On the central action proteins, two brain regions frequently appear in the data analysis; the prefrontal cortex and hippocampus; then, we built a network for each region (Prefrontal Cortex and Hippocampus).

In the stylization of the analyzed network, we used different sizes for the nodes. Node size corresponds to the number of times each protein was cited in the analyzed literature, with larger nodes representing more cited proteins and smaller nodes representing less cited proteins. Also, the red and green colors of the nodes indicate gene regulation, with red indicating down-regulation and green representing up-regulation.

Calculation of cut-off point

For the protein network analysis, we made a cut-off point. We identified the median of citations, and for the network of selected proteins, we used only the upper quartile (Q3). Furthermore, we assembled a matrix where in m (rows) were the proteins and in n (columns) the magnitudes of Citations, Betweenness Centrality, Degree, and Closeness Centrality obtained through the software Cytoscape.

We calculated the mean square error with the matrix constructed from these data. For the study, we selected the proteins with a distance ≥ 0.5 .

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

RESULTS

***Rattus norvegicus* network**

From constructing the protein-protein interaction network in the three organisms studied, we observed proteins present in pathways that may be related to TDR. Thus, we analyzed each network separately, resulting in 36 proteins for the *Rattus norvegicus* network, 12 up-regulated and 24 down-regulated (Figure 3).

Using the distance ≥ 0.5 , we arrived at the final number of 10 proteins, seven down-regulated and three up-regulated (Figure 4). Among them, we have subunits of glutamate receptors (Grin1, Grin2a, Grin2b, Gria1, Gria2, Gria4), cellular transcription factor (Creb1), mitogen-activated protein kinase (Mapk3) and brain-derived growth factor (BDNF). The up-regulated proteins found in the study were Grin1, Grin2a, and Gria2, while the down-regulated ones were Mapk3, Dlg4, Creb1, Bdnf, Gria1, Gria4, and Grin2b. Thus, two main pathways are related to these proteins, the AKT/mTOR pathway and the glutamate receptor-related pathway.

***Mus musculus* Network**

The network obtained from the proteins in the *Mus musculus* model has 49 proteins (16 up-regulated and 23 down-regulated) (Figure 5). Using the selection of proteins only with distances ≥ 0.5 , we reached a network formed by 14 proteins. These are four up-regulated, among them some inflammatory markers, and nine down-regulated, related to glutamate receptors (Gria1 and Gria4), cellular transcription signaling for survival and proliferation (Akt, mTOR, and Gsk3b), mitogen-activated protein kinase (Mapk1 and Mapk3) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Figure 6).

***Homo sapiens* Network**

The *Homo sapiens* network showed 131 TRD-related proteins (Figure 7). Thus, we selected only proteins with distances ≥ 0.5 , resulting in a network formed by 43 proteins. In addition, we found 13 down-regulated and 15 up-regulated proteins (Figure 8). In this species, we found proteins related to five main pathways, the AKT/mTOR pathway, inflammation, and expression of glutamate, serotonin, and opioid receptors.

Network Intersection

In the intersection network of the studied species (Figure 9), we can find three common pathways, the AKT/MTOR pathway, the pathway related to the subunits of glutamate receptors (NMDA and AMPA), and proteins related to the inflammatory hypothesis. These markers are candidate targets for studies on pharmacological resistance to antidepressants. In addition, we observed a more significant amount of inhibited than up-regulated proteins at the intersection of the networks and a predominance in peripheral proteins.

Central Networks

Prefrontal cortex

In rats, we observed the up-regulated NMDA receptor and the down-regulated AMPA receptor in the prefrontal cortex (Figure 10). Similarly, the NMDA receptor (Grin1) in mice is down-regulated (Figure 11), as is the dopamine receptor (Drd1). Already in the protein-protein interaction network of the prefrontal cortex in humans (figure 12), we find proteins such as Ntrk2, the serotonin receptor 7 (HTR7), and CREB down-regulated. In addition, we find two up-regulated proteins, the NMDA receptor (Grim1) and MAO (monoamine oxidase).

Hippocampus

In rats, the network (Image 13) highlights some down-regulated proteins that are related to cell survival and neural plasticity, among them Akt (Akt1 and 2), mTOR, Mapk (Mapk1, 2 and 3), and AMPA (Gria 2, 3 and 4). Other proteins that appear up-regulated are IDO and TNF. In the interaction network of the hippocampus in mice (image 14), we also find the Mapk protein down-regulated. Besides it, the CREB protein is also down-regulated. On the other hand, proteins such as Ido1 and Tnf are once again present with their up-regulation. Also, pro-inflammatory proteins such as Il6 and Il1b are up-regulated, corroborating the studies correlating neuroinflammation with TRD.

In the hippocampus network in humans (Image 15), we can find evidence of some proteins already mentioned in other organisms, such as AKT1, mTOR, CREB, and AMPA (Gria4), all down-regulated. However, again, we find TNF, pro-inflammatory interleukins (IL1b and IL5), and the NMDA receptor up-regulated. Besides these proteins, we can point out some that were not present in the other organisms studied, such as the downregulation of opioid receptors (OPRD1 and CPRM1), FAS, and NTRK2.

DISCUSSION

According to the findings of our systematic review, the main markers associated with pharmacological resistance in depression are involved with signaling pathways linked to Akt/mTOR, the inflammatory hypothesis of pharmacological resistance, and the metabolism and action of glutamate and serotonin.

As mentioned, glutamate receptors are closely linked to major depressive disorder and pharmacological resistance to depression. In our study, we observed a low expression of the AMPA receptor (*Gria1* and *Gria4*) and a high expression of the NMDA receptor (*Grin1* and *Grin2a*), correlating the excitability of NMDA receptors due to stress and the excitotoxicity generated by long-term activation of these NMDA receptors in TRD.

We have three main subtypes of ionotropic glutamatergic receptors, the AMPA, the kainate, and the NMDA. These receive their nomenclature according to the type of synthetic agonist that activates them (α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionic acid, kainate, and N-methyl-D-aspartate, respectively). Ionotropic glutamatergic receptors are excitatory; AMPA is activated by the binding of glutamate on the receptor, thus Na⁺ flows to the intracellular face of the neuron's membrane, and K⁺ moves outward, generating a depolarization in the neuronal soma, which characterizes its excitatory activity. When depolarization of the soma occurs, and therefore the binding of glutamate at the NMDA receptor, the protein channel is unobstructed, increasing the membrane conductance to Na⁺ and Ca⁺. Importantly, calcium has essential cellular functions, consolidating memory, increasing BDNF expression, and facilitating neurotransmitter traffic. However, excess Ca⁺ in the neuronal soma causes excitotoxicity since this ion can increase the production of reactive oxygen species and is involved with inflammation and apoptosis.

Esketamine, an NMDA receptor antagonist, decreases its conductance, and NMDA inhibition, in turn, generates AMPA hyperexcitability, increasing BDNF expression and decreasing the excitotoxicity generated by NMDA receptor hyperactivity [18,19]. Furthermore, studies demonstrate antidepressant effects when drugs act directly by activating AMPA receptors and inhibiting NMDA receptors in the prefrontal cortex region of mice [20,21]. Thus, as we observed a lower activity of AMPA receptors and an increase in the activity of NMDA receptors, we can associate this molecular signal as one of the characteristics of pharmacological resistance in depression.

The Akt protein is one of the molecular markers of AMPA receptor cell signaling and is involved with increased BDNF expression. The AKT protein is responsible for cell signaling for cell survival and proliferation, from the phosphorylation of the mTOR protein and the phosphorylation of MAPK3 by Ras [22,23]. From this signal, one notices the activation of the transcription factor CREB, which increases BDNF expression. CREB is an essential protein directly correlated with central nervous system cell survival, so it occurs in the CREB metabolic cascade that BDNF activation occurs [22,23]. BDNF is related to neuronal survival and plasticity, just as its absence correlates with neurodegeneration and suicidal symptoms [19]. Thus, in the protein network constructed in our study, the low expression of Akt3, MAPK3, and BDNF strengthens the correlation between neuronal cell apoptosis and low plasticity in TRD.

As in the *Rattus norvegicus* animal model, the protein-related pathways in the network are from the AKT/mTOR pathway and glutamate receptors. Also, we can identify inflammatory markers, which, when appearing up-regulated, can correlate with the strengthening of the inflammatory profile. Studies show that chronic stress can trigger desensitization of the HPA axis by increasing cortisol levels. High cortisol levels are involved in a pro-inflammatory response, activating pro-inflammatory interleukins.

Because of the increased inflammatory profile in this model, the blood-brain barrier becomes permeable, allowing the migration of monocyte, lymphocytes, macrophages, and other immune system cells from the bloodstream into the central nervous system [8,19,21].

The inflammatory profile demonstrated by the expression of inflammatory proteins such as TNF, C-reactive protein (CRP), IL1A, IL2, and CD4 negatively influences the AKT/mTOR pathway [8,21]. In addition, these markers may correlate with the down-regulation of AKT, mTOR, Creb, and MAPk3 proteins, all involved with cell signaling for cell survival and proliferation. Also, inflammation alters the expression of ionotropic receptors such as NMDA (up-regulation) and AMPA (down-regulation). It may cause an increase in reactive oxygen species production and excitotoxicity mediated by increased NMDA activity and decreased AMPA [8,21]. Thus, the inflammatory profile of the central nervous system may be involved with alterations in the expression of glutamate and serotonin receptors, leading to inhibition of the AKT/mTOR pathway. In addition, inflammation increases the activity of the IDO enzyme. The IDO protein has the function of converting tryptophan into kynurenine. Thus, as IDO is up-regulated, there is an increase in kynurenine concentration, decreasing serotonin synthesis and generating neurotoxicity [24]. These responses may be related to the characteristics of depressive behavior and pharmacological resistance to depression [8,21].

In addition to promoting changes in the inflammatory profile and, consequently, in glutamatergic receptor activity and neuroplasticity, stress causes the deregulation of both dopamine metabolism and receptor transcription. The decrease in receptor synthesis causes a reduction in dopamine receptor density in the prefrontal cortex region [25]. In addition, CREB1, BDNF, and Arc proteins present down-regulated, as cited earlier. Since Creb activation is linked to BDNF activation, resulting in cell proliferation and neuronal survival, and the Arc protein regulates synaptic plasticity, inhibition of these pathways may be involved with one of the main consequences of TDM, neurodegeneration [22,23]. Other altered proteins in the rodent prefrontal cortex are Mapk1 and IL1b. Increased Mapk1 is related to improved neural plasticity and regulation of anti-inflammatory processes. Once this protein is down-regulated, we note a decrease in plasticity and increased signaling of inflammatory responses. This hypothesis may be strengthened by the observed up-regulation of interleukin 1b (IL1b) [26].

Another protein that plays an essential role in neuroplasticity is Nrtk2. Therefore, once we visualize a down-regulation of this protein, these neural functions seem to be impaired, increasing the neurodegenerative potential in this disorder [27,28].

In the prefrontal cortex, we verified a down-regulation of the serotonin receptor HTR7 and an up-regulation of the 5HT2a receptor. This reduction involves a decrease in serotonergic activity because the HTR7 receptor is coupled to an excitatory G protein that when stimulated by 5-HT, promotes excitatory postsynaptic potentials [29]. In the studied region, the main monoamines found are the neurotransmitters (NA, DA, and 5-HT), which, when going through the oxidative process, are degraded in the synaptic cleft [30,31]. In addition, there are some controversies in the literature regarding regulating serotonergic receptors. Some studies show that the up-regulation of the serotonin receptor (5HT2a) is related to the low bioavailability of serotonin in the synaptic cleft due to its hyperactivity. Thus, pharmacological resistance to antidepressants may be related to the increased expression of this receptor [32,33].

Another family of receptors that seems to be involved with TRD is the opioid family. Opioid receptors have an excitatory response; once the opioid binds to the receptor, a calcium channel is opened, releasing neurotransmitters 5-HT, NA, and DA. Since, in our study, the opioid receptors (OPRD1 and CPRM1) are downregulated, the

excitatory neurotransmitter response appears to be attenuated, demonstrating a correlation with depressive symptoms [32,34]. From the data extracted from the analysis of the three models, we can infer that a hypoactivity of cortical regions may occur in TDR since we found proteins that decrease the concentration of neurotransmitters or degrade them, in addition to other proteins related to neural death, decreasing cell proliferation and neuronal plasticity.

CONCLUSION

We suggest a relationship between the three main pathways involving the proteins found in the studies with resistant depressive disorder. Markers involved in the inflammatory hypothesis, proteins participating in the AKT/mTOR pathway, and the pathway related to glutamate receptor subunits were identified in all three species studied. In addition to these pathways, we found essential proteins correlated to serotonergic and opioid receptors in humans. Furthermore, this information may provide a basis for future preclinical studies and the search for new adjuvant therapies to treat resistant depressive disorder.

REFERENCES

1. CAMERON C, HABERT J, ANAND L, FURTADO M. Optimizing the management of depression: primary care experience. *Psychiatry Res.* V.220, p.45-57. Dec 2014.
2. CARTERI RB, OSES JP, DE T; *et al.* A closer look at the epidemiology of schizophrenia and common mental disorders in Brazil. v. 14, n. 3, p. 283–289, 2020. Available from: <https://doi.org/10.1590/1980-57642020dn14-030009>
3. ZUSKY PM, *et al.* Adjunct low dose lithium carbonate in treatment-resistant depression: a placebo-controlled study. *Journal Clin Psychopharmacol.* v.8, n. 2, p. 120-124, 1988.
4. FAVA M. Diagnosis and definition of treatment -resistant depression. *Biological psychiatry.* v. 53, n 8, p. 649-659. 2003
5. SWAINSON J, *et al.* Esketamine for treatment resistant depression. *Expert Review of Neurotherapeutics*, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 899–911, 2019. Available from: <https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1640604>
6. KIM YK, MAES M, The role of the cytokine network in psychological stress. *Acta neuropsychiatr* v. 15, p. 148–155, 2003.
7. KIM YK, KYOUNG-SAE NB, AYE-MU MC, BRIAN EL. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* V. 64, p. 277-284. 2016.
8. KIM MH, GOROUHI F, RAMIREZ S, *et al.* Catecholamine Stress Alters Neutrophil Trafficking and Impairs Wound Healing by β 2 -Adrenergic Receptor–Mediated Upregulation of IL-6. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 134, n. 3, p. 809–817, 2014. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15366860>.
9. PERRY SF, REID SD. β -adrenergic signal transduction in fish: interactive effects of catecholamines and cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 11, n. 1-6, p. 195–203, 1993. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00004567>.
10. SOUSA RT, *et al.* Challenging Treatment-Resistant Major Depressive Disorder: A Roadmap for Improved Therapeutics. *Current Neuropharmacology*, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 616–635, 2015. Available from: <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150630173522>
11. WOLKOWITZ OM, REUS VI. Treatment of depression with antiglucocorticoid drugs. *Psychosomatic Medicine*; v. 61, p. 698-711, 1999.
12. SARAIVA EM, FORTUNATO JMS, GAVINA C. Oscilações do cortisol na depressão e sono/vigília. *Revista Portuguesa de Psicossomática.* v. 7, n. 1-2, p. 89-100. 2005.

13. VOGELZANGS N, et al. Inflammatory and metabolic dysregulation and the 2-year course of depressive disorders in antidepressant users. *Neuropsychopharmacology*, v. 39, n. 7, p. 1624-1634, 2014. Available from: <https://www.nature.com/articles/npp20149>
14. ROSENBLAT J, et al. Beyond Monoamines- Novel Targets for Treatment-Resistant Depression: A Comprehensive Review. *Current Neuropharmacology*, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 636-655, 2015. Available from: <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150630175044>
15. CORDEIRO AM, MARTINS Y, RENTERIA JM, et al. Revisão sistemática: uma revisão narrativa. v. 34, n. 6, p. 428-431, 2007. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912007000600012>.
16. COOK DJ, MULROW CD, HAYNES RB. Systematic reviews: synthesis of best evidence for clinical decisions. *Ann Intern Med*. V. 126, n. 5, p. 376-380, 1997.
17. NETTO B. P. O. Grafos: Teoria, Modelos, Algoritmos, 4ª Edição Revista e Ampliada, Edgar Blucher. 2006.
18. PAPP M, et al. AMPA receptors mediate the pro-cognitive effects of electrical and optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex in antidepressant non-responsive Wistar-Kyoto rats. *Journal of Psychopharmacology*, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 1418-1430, 2020. Available from: <https://doi.org/10.1177/0269881120967857>
19. KANDEL E, et al. Princípios de neurociências-5. AMGH Editora, 2014.
20. AUTRY AE, et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, v. 475, n. 7354, p. 91-95, 2011.
21. YANG C, et al. Inflammatory markers and treatment outcome in treatment resistant depression: A systematic review. *Journal of Affective Disorders*, [s. l.], v. 257, p. 640-649, 2019. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.07.045>
22. MURCK H. Ketamine, magnesium and major depression - From pharmacology to pathophysiology and back. *Journal of Psychiatric Research*, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 955-965, 2013. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.02.015>
23. PASTUZYN ED et al. The neuronal gene arc encodes a repurposed retrotransposon gag protein that mediates intercellular RNA transfer. *Cell*, v. 172, n. 1-2, p. 275-288. e18, 2018.
24. VAN BAREN N, VAN DEN EYNDE BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol*. 2015 Feb 3. 6, 34. 2015.
25. ZHANG Y, et al. Dopamine receptor D2 and associated microRNAs are involved in stress susceptibility and resistance to escitalopram treatment. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1-10, 2015. Available from: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv025>
26. CALATI R, et al. Antidepressants in elderly: metaregression of double-blind, randomized clinical trials. *Journal of affective disorders*, v.147 n1-3, p.1-8. 2013
27. HANIU M, et al. Extracellular domain of neurotrophin receptor trkB: disulfide structure, N-glycosylation sites, and ligand binding. *Archives of biochemistry and biophysics*, v.322 n.1, p.256-264. 1995.
28. YEO GS, et al. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nature neuroscience*, v.7 n.11, p. 1187-1189. 2004.
29. VADODARIA KC, et al. Altered serotonergic circuitry in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons. *Molecular Psychiatry*, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 808-818, 2019a. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0377-5>
30. PITON, A., et al. 20 ans après: a second mutation in MAOA identified by targeted high-throughput sequencing in a family with altered behavior and cognition. *European journal of human genetics : EJHG*, v. 22 n. 6, p. 776-783. 2014.
31. SON, SY. et al. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105 n.15, p. 5739-5744. 2008.

32. MATHYS M, MITCHELL BG, Targeting treatment-resistant depression. *Journal of Pharmacy Practice*, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 520–533, 2011. Available from: <https://doi.org/10.1177/0897190011426972>
33. MORRIS *et al.* NIH Public Access. *Gerontology*, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 515–525, 2015. Available from: <https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e31825d70d6.A>
34. MILLER OH, MORAN JT, HALL BJ. Two cellular hypotheses explaining the initiation of ketamine's antidepressant actions: Direct inhibition and disinhibition. *Neuropharmacology*, [s. l.], v. 100, p. 17–26, 2016. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.028>

FIGURES

Figure 01

CONSTRUCT 1 Depression Study Model	CONSTRUCT 2 Treatment Resistant Depression
Corticosterone model	Depressive Disorder Treatment Resistant
LPS model	Therapy-Resistant Depression
Social defeat model	Treatment Resistant Depression
Learned helplessness model	Refractory Depression
Genetic model	
Chronic unpredictable stress model	
Chronic variable stress model	
Maternal deprivation model	
Neonatal dexamethasone exposure model	
Rat model of depression	
Mice model of depression	

Figure 02

String de Busca

"corticosterone model" OR "LPS model" OR "social defeat model" OR "learned helplessness model" OR "genetic model" OR "chronic unpredictable stress model" OR "chronic variable stress model" OR "maternal deprivation model" OR "neonatal dexamethasone exposure model" OR "depressive disorder, major [MeSH Terms]" OR "depressive disorder [MeSH Terms]" OR "rat model of depression" OR "mice model of depression" OR "rodent model of depression AND Depressive Disorder Treatment Resistant" OR "Refractory Depression" OR "Therapy-Resistant Depression" OR "Treatment Resistant Depression" [MeSH Terms]"

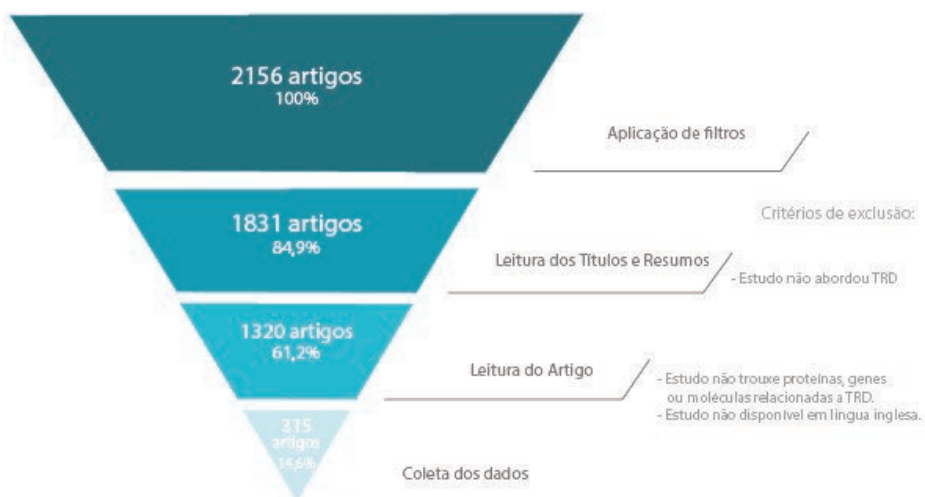


Figure 03

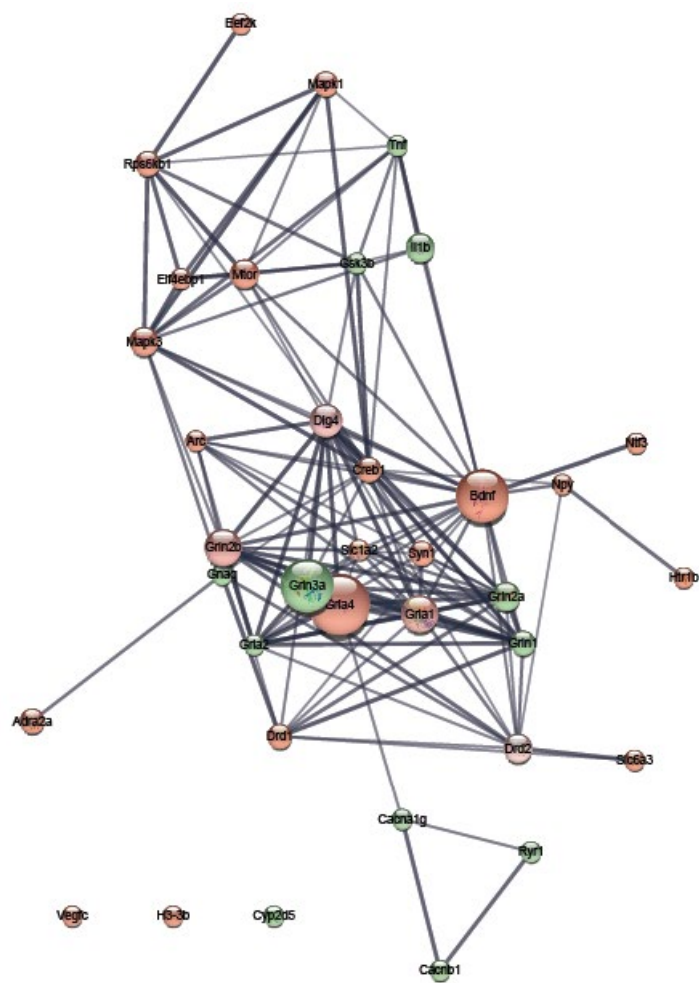


Figure 04

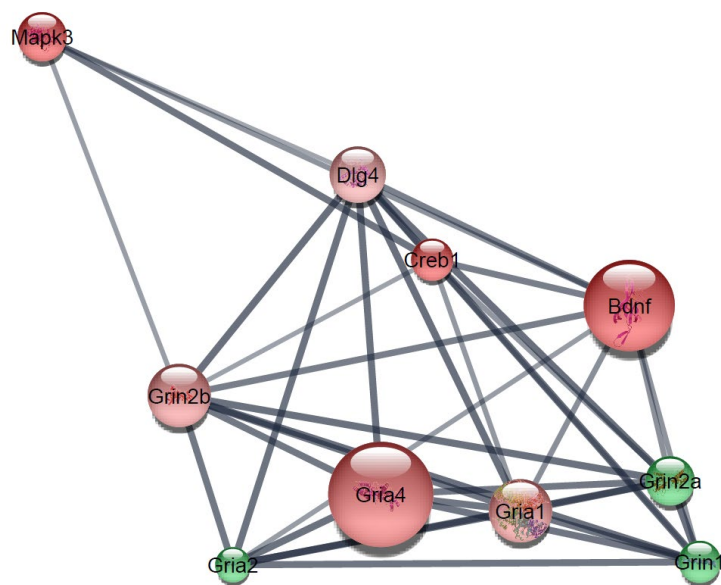


Figure 07

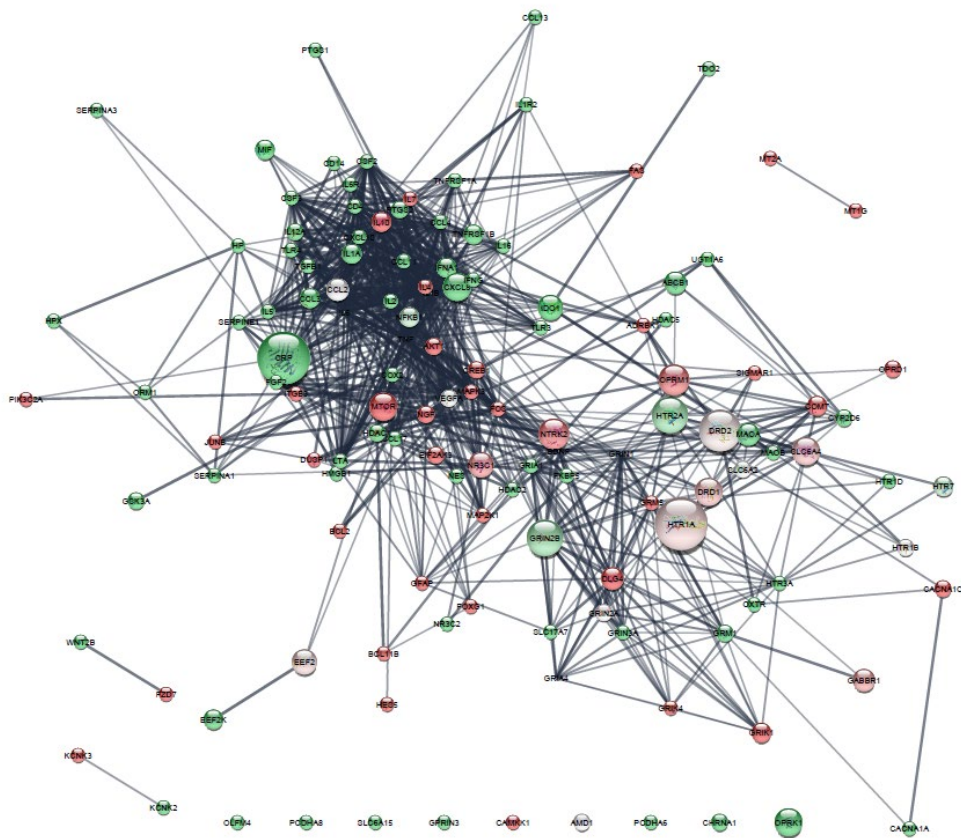


Figure 08

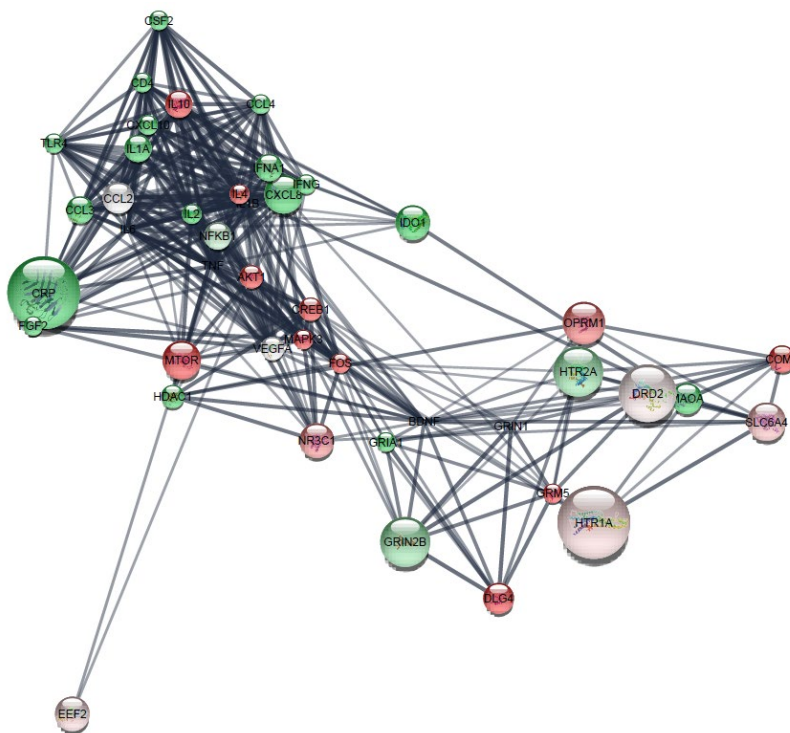


Figure 09

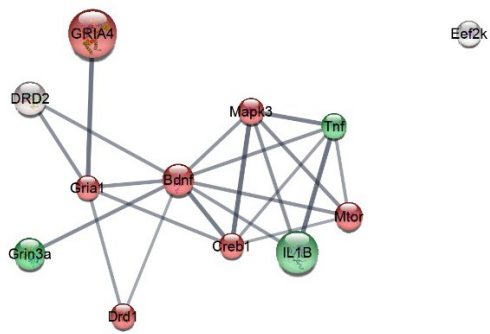


Figure 10

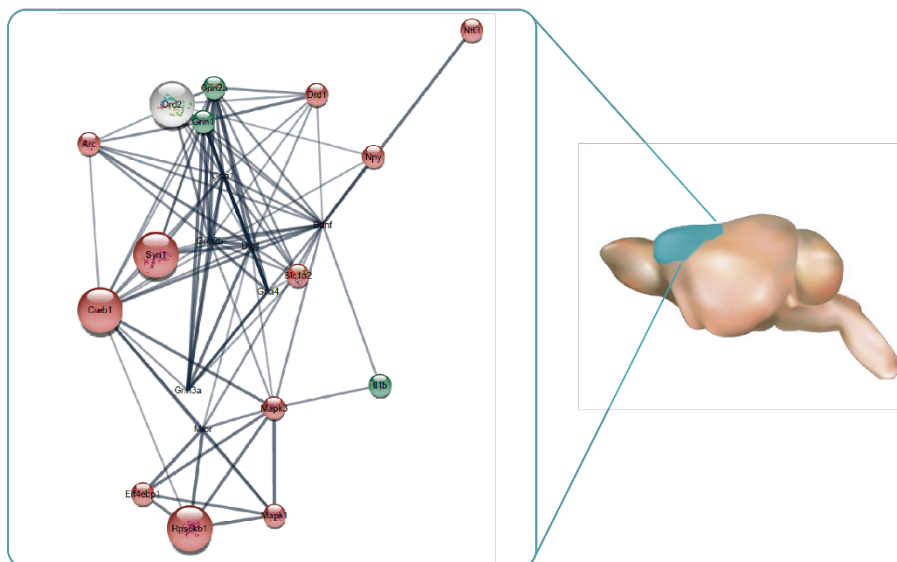


Figure 11

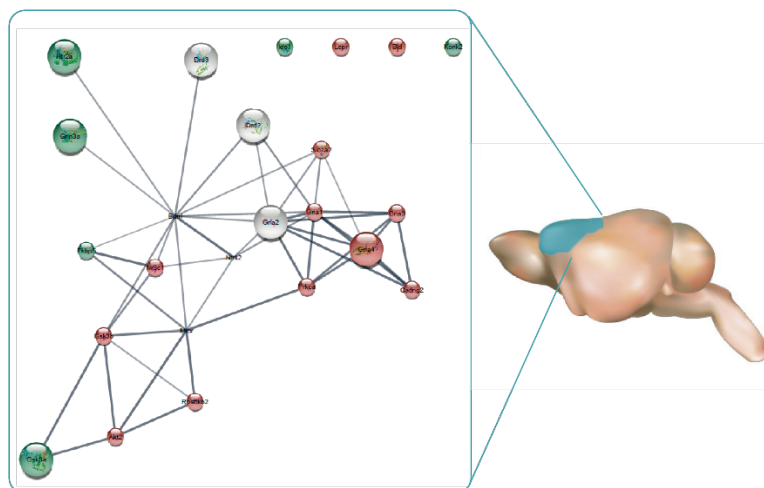


Figure 14

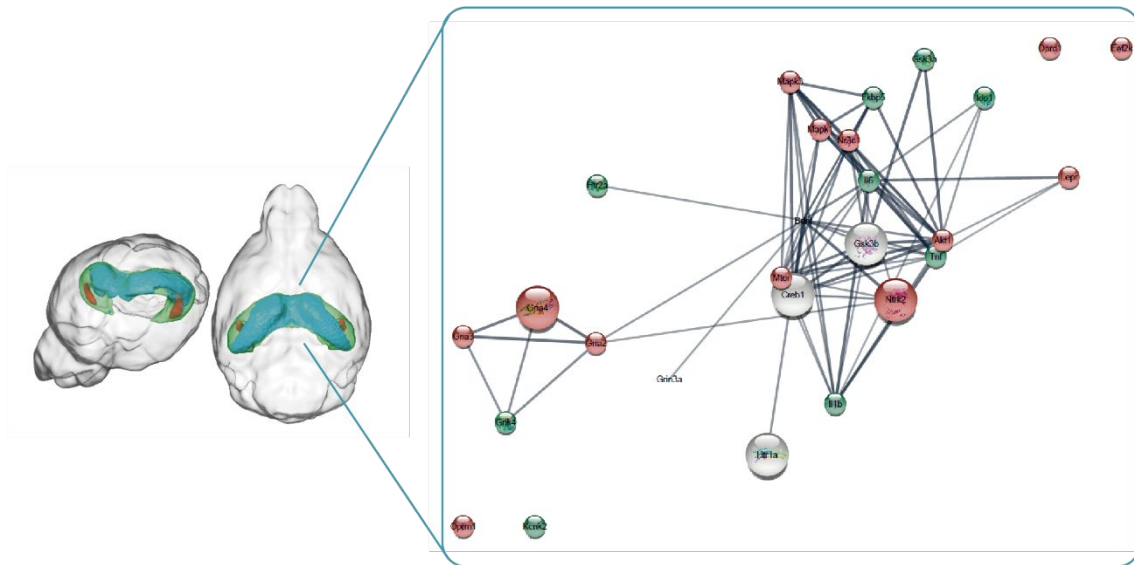


Figure 15

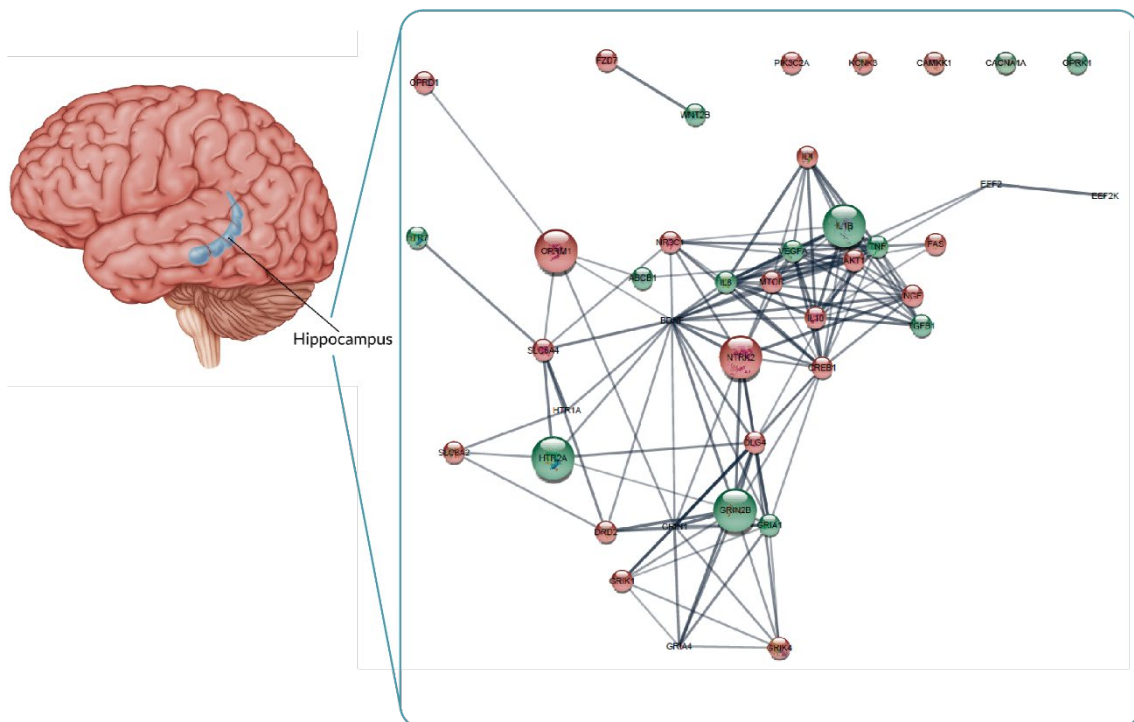


FIGURE CAPTIONS

Figure 1 – Two constructs made for the systematic review, the first one related to the animal models of depression and the second one to treatment-resistant depression.

Figure 2 - Methodology of article selection, including the study's inclusion criteria.

Figure 3 - The protein-protein interaction network in *Rattus norvegicus*

Figure 4 – The select protein-protein interaction network in *Rattus norvegicus*

Figure 5 - The protein-protein interaction network in *Mus musculus*

Figure 6 - The select protein-protein interaction network in *Mus musculus*.

Figure 7 – The protein-protein interaction network in *Homo sapiens*

Figure 8 – The select protein-protein interaction network in *Homo sapiens*.

Figure 9 – The intersection of protein-protein interaction networks.

Figure 10 – The protein-protein interaction network in the pre-frontal cortex region in *Rattus norvegicus*

Figure 11 – The protein-protein interaction network in the pre-frontal cortex region in *Mus musculus*

Figure 12 – The protein-protein interaction network in the pre-frontal cortex region in *Homo sapiens*

Figure 13 – The protein-protein interaction network hippocampus region in *Rattus norvegicus*

Figure 14 – The protein-protein interaction network in the hippocampus region in *Mus musculus*

Figure 15 – The protein-protein interaction network in the hippocampus region in *Homo sapiens*

COVER LETTER

Ning Quan and Cobi J. Heijnen
Editor-in-chief
Psychoneuroimmunology Journal

May 27th, 2023.

Dear Editor,

We are submitting to your appreciation the manuscript entitled **"IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS IN TREATMENT-RESISTANT DEPRESSION USING IN SILICO ANALYSIS"** for publication in the category of the original article in the Psychoneuroimmunology Journal.

We used an In silico approach to identify possible molecular markers involved with treatment-resistant of major depressive disorder. This study shows a relationship between markers involved in the inflammatory hypothesis, proteins participating in the AKT/mTOR pathway, and the pathway related to glutamate receptor subunits with treatment-resistant major depressive disorder. In addition to these pathways, we found essential proteins correlated to serotonergic and opioid receptors in humans. Furthermore, this information may provide a basis for future preclinical studies and the search for new adjuvant therapies to treat resistant depressive disorder.

We affirm that the paper has not been published in this or a similar form (in print or electronically, including on a website), accepted for publication elsewhere, nor is under consideration by another journal. Therefore, we have no conflict of interest concerning this work; all authors agree with the manuscript's content. Thank you for considering our manuscript for publication in your journal. We are looking forward to hearing from you soon.

With best regards,

Rafael Colombo, Ph.D.
Biotechnology Institute – UCS
Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130.
CEP 95070-560 - Caxias do Sul – RS – Brasil
Email: rcolombol@ucs.br
Telephone: 552151 991348476

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-DIAZ, Elia E. *et al.* **Comprehensive assessment of side effects associated with a single dose of ketamine in treatment-resistant depression.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2020. ISSN 15732517.v. 263 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.11.028>
- ADLI, M. *et al.* Algorithms for Optimizing the Treatment of Depression: Making the Right Decision at the Right Time. **Pharmacopsychiatry**, [s. l.], v. 36, n. SUPPL. 3, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2003-45134>
- ALTINAY, Murat; KARNE, Harish; ANAND, Amit. Administration of Sub-anesthetic Dose of Ketamine and Electroconvulsive Treatment on Alternate Week Days in Patients with Treatment Resistant Depression: A Double Blind Placebo Controlled Trial. **Psychopharmacology bulletin**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 8–16, 2019.
- ANAND, Amit *et al.* Antiglucocorticoid treatment of refractory depression with ketoconazole: A case report. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 338–340, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(94\)00245-X](https://doi.org/10.1016/0006-3223(94)00245-X)
- ANDRADE, Chittaranjan. Intranasal drug delivery in neuropsychiatry: Focus on intranasal ketamine for refractory depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. e628–e631, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4088/JCP.15f10026>
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- ARONSON, Ronnie; et al. Triiodothyronine Augmentation in the Treatment of Refractory Depression. **Archives Of General Psychiatry.** v.53, p. 842-848. 1996.
- AUTRY, Anita E. et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 91-95, 2011.
- BALDESSARINI, R. J. Depression and mania. In: **Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics.** Ed. 9, McGraw-Hill, New York, p. 314-334, 1996.
- BALDINGER-MELICH, Pia *et al.* The effect of electroconvulsive therapy on cerebral monoamine oxidase A expression in treatment-resistant depression investigated using positron emission tomography. **Brain Stimulation**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 714–723, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brs.2018.12.976>

BARTON, Cynthia *et al.* A double-blind trial of bupropion versus desipramine for bipolar depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 391–393, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hup>

BAUER, Michael *et al.* Lithium Augmentation Therapy in Refractory Depression: Clinical Evidence and Neurobiological Mechanisms. **Canadian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 440–448, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/070674370304800703>

BAVARESCO, Daniela V. *et al.* Efficacy of infliximab in treatment-resistant depression: A systematic review and meta-analysis. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 188, n. December 2019, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.172838>

BIRKENHÄGER, T. K.; VEGT, M.; NOLEN, W. A. An open study of triiodothyronine augmentation of tricyclic antidepressants in inpatients with refractory depression. **Pharmacopsychiatry**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 23–26, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2007-979478>

BOZYMSKI, Kevin M. *et al.* Esketamine: A Novel Option for Treatment-Resistant Depression. **Annals of Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 567–576, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1060028019892644>

BUSPAVANICH, Pichit *et al.* Treatment response of lithium augmentation in geriatric compared to non-geriatric patients with treatment-resistant depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 251, n. December 2018, p. 136–140, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.03.057>

BSCHOR, Tom *et al.* Lithium augmentation increases post-dexamethasone cortisol in the dexamethasone suppression test in unipolar major depression. **Depression and Anxiety**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 43–48, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/da.10078>

BSCHOR, Tom; BAUER, Michael. Efficacy and Mechanisms of Action of Lithium Augmentation in Refractory Major Depression. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 12, n. 23, p. 2985–2992, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138161206777947650>

CALATI, Raffaella *et al.* Antidepressants in elderly: metaregression of double-blind, randomized clinical trials. **Journal of affective disorders**, v.147 n.1-3, p.1–8. 2013.

CAMERON C, HABERT J, ANAND L, FURTADO M. Optimizing the management of depression: primary care experience. **Psychiatry Res.** V.220, p.45-57. Dec 2014,

CARACI, F. *et al.* International union of basic and clinical pharmacology CIV: The neurobiology of treatment-resistant depression: From antidepressant classifications to novel pharmacological targets. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 475–504, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.117.014977>

CARMICHAEL, Owen; LOCKHART, Samuel. Neurotrophins and. **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], n. November 2011, p. 289–320, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/7854>

CARRINGTON, Paul E. et al. The Structure of FADD and Its Mode of Interaction with Procaspase-8. **Cell Press Journal**. v. 22, n. 5, p. 599-610. 2006 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.04.018>

CARVALHO, André F. *et al.* The integrative management of treatment-resistant depression: A comprehensive review and perspectives. **Psychotherapy and Psychosomatics**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 70–88, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000357500>

CARTERI, Randhall Bruce; OSES, Jean Pierre; DE, Taiane; *et al.* A closer look at the epidemiology of schizophrenia and common mental disorders in Brazil. v. 14, n. 3, p. 283–289, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-57642020dn14-030009>

CATALANO, Glenn *et al.* Antidepressant Augmentation: A Review of the Literature and a Review of the Pharmacoeconomic Considerations. **Journal of clinical psychopharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 396–400, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000001236>

CHANG, Lijia *et al.* Comparison of antidepressant and side effects in mice after intranasal administration of (R,S)-ketamine, (R)-ketamine, and (S)-ketamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 181, p. 53–59, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.04.008>

CHEN, Mu Hong *et al.* Antisuicidal effect, BDNF Val66Met polymorphism, and low-dose ketamine infusion: Reanalysis of adjunctive ketamine study of Taiwanese patients with treatment-resistant depression (AKSTP-TRD). **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 251, n. 201, p. 162–169, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.03.075>

CHEN, Mu Hong *et al.* Maintenance of antidepressant and antisuicidal effects by D-cycloserine among patients with treatment-resistant depression who responded to low-dose ketamine infusion: a double-blind randomized placebo–control study. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 2112–2118, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0480-y>

COOK, D.J.; MULROW, C.D.; HAYNES, R.B. Systematic reviews: synthesis of best evidence for clinical decisions. **Ann Intern Med**. V. 126, n. 5, p. 376-380, 1997.

CORDEIRO, Alexander Magno; MARTINS, Yanne; RENTERIA, Juan Miguel; *et al.* Revisão sistemática: uma revisão narrativa. v. 34, n. 6, p. 428–431, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912007000600012>.

COSTI, Sara *et al.* Lithium continuation therapy following ketamine in patients with treatment resistant unipolar depression: a randomized controlled trial. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 1812–1819, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0365-0>

COVVEY, Jordan R.; CRAWFORD, Alexis Noble; LOWE, Denise K. Ketamina Intravenosa para la Depresión Mayor Resistente al Tratamiento. **Annals of Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 117–123, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1345/aph.1Q371>

DALE, Roman M. *et al.* The NEO-FFI domain of openness to experience moderates ketamine response in treatment resistant depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 260, n. May 2019, p. 323–328, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.09.010>

DE BERARDIS, Domenico *et al.* Adjunctive vortioxetine for ssri-resistant major depressive disorder: A “real-world” chart review study. **Brazilian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 317–321, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2019-0690>

DEICKEN, Raymond F. Combined alprazolam and phenelzine treatment of refractory depression with panic attacks. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 762–766, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(87\)90208-3](https://doi.org/10.1016/0006-3223(87)90208-3)

DE KLOET, E.R., *et al.* Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews** v. 19, p. 269–301, 1998.

DELGADO, Pedro L. *et al.* Efficacy of fluvoxamine in treatment-refractory depression. **Journal of Affective Disorders**. v. 15, p. 55-60 1988.

DE SOUSA, Rafael T. *et al.* Challenging Treatment-Resistant Major Depressive Disorder: A Roadmap for Improved Therapeutics. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 616–635, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150630173522>

DETLEF, E; DIETRICH, M D; HINDERK, M. The Use of Anticonvulsants to Augment Antidepressant Medication. **Journal of Clinical Psychiatry** [s. l.], v. 59, n. suppl 15, p. 19–27, 1998.

DEWILDE, Kaitlin E. *et al.* The promise of ketamine for treatment-resistant depression: current evidence and future directions. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1345, n. 1, p. 47-58, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.11.010.Effects>

DOWBEN, Jonathan S.; GRANT, Joan S.; KELTNER, Norman L. Biological Perspectives: Ketamine as an Alternative Treatment for Treatment-Resistant Depression Biological Perspectives: Ketamine as an Alternative Treatment for Treatment-Resistant Depression. **Perspectives in Psychiatric Care**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 2–4, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ppc.12006>

DOWELL, Deborah; HAEGERICH, Tamara; CHOU, Roger. HHS Public Access Author manuscript References : [s. l.], v. 379, n. 20, p. 1971–1972, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.06.065>.Location

EMMANUEL, Thanos. Remission of treatment-resistant depression with tardive akathisia with electroconvulsive therapy. **BMJ Case Reports**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 10–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bcr-2019-229714>

ERICKSON, Kathryn K.; ZHU, Junjia; LAZARUS, Philip. Olanzapine metabolism and the significance of the UGT1A448V and UGT2B1067Y variants. **Pharmacogenet Genomics**. v. 21, n. 9, p. 539-55. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e328348c76b>.

FAVA, Maurizio. Diagnosis and definition of treatment -resistant depression. **Biological psychiatry**. v. 53, n 8, p. 649-659. 2003

FENG, Mengyang *et al.* Reversal of a Treatment-Resistant, Depression-Related Brain State with the Kv7 Channel Opener Retigabine. **Neuroscience**, [s. l.], v. 406, p. 109–125, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.003>

FERNANDES, Brisa *et al.* Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is not associated with response to electroconvulsive therapy (ECT): A pilot study in drug resistant depressed patients. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 453, n. 3, p. 195–198, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.032>

FONTAINE, R. *et al.* Lithium carbonate augmentation of desipramine and fluoxetine in refractory depression. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 946–948, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(91\)90062-Q](https://doi.org/10.1016/0006-3223(91)90062-Q)

FORNARO, Michele *et al.* Brexpiprazole for treatment-resistant major depressive disorder. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 20, n. 16, p. 1925–1933, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1654457>

FRANKLIN, M. *et al.* Pineal Melatonin in a Sub-chronic Tryptophan Depletion Female Rat Model of Treatment-resistant Depression. **Pharmacopsychiatry**, [s. l.], v. 48, n. 4–5, p. 181–183, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0035-1554711>

GÁLVEZ, Juan F. *et al.* The medial forebrain bundle as a deep brain stimulation target for treatment resistant depression: A review of published data. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 58, p. 59–70, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.12.003>

GILBERT, Jessica R.; ZARATE, Carlos A. Electrophysiological biomarkers of antidepressant response to ketamine in treatment-resistant depression: Gamma power and long-term potentiation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 189, p. 1–20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172856>

GLOVER, V.; et al.; **Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man.** *Nature*, v. 265, p. 80. 1977.

HAILE, C. N. et al. Plasma brain derived neurotrophic factor (BDNF) and response to ketamine in treatment-resistant depression. **International Journal Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 711–716, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1461145713001119>.

HALARIS, Angelos *et al.* Modulation of the inflammatory response benefits treatment-resistant bipolar depression: A randomized clinical trial. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 261, n. October 2019, p. 145–152, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.10.021>

HANIU M, et al . Extracellular domain of neurotrophin receptor trkB: disulfide structure, N-glycosylation sites, and ligand binding. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.322 n.1, p.256–264. 1995.

HUGHES, Z. A. *et al.* Negative allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5 results in broad spectrum activity relevant to treatment resistant depression. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 66, p. 202–214, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.007>

HULLETT, Joseph; BIDDER, George. Phenelzine plus triiodothyronine combination in a case of refractory depression. **The journal of nervous and mental disease**. v. 171. n. 5, p. 318-320. 1983.

HUSAIN, Muhammad Ishrat *et al.* Minocycline as adjunctive treatment for treatment-resistant depression: Study protocol for a double blind, placebo-controlled, randomized trial (MINDEP2). **BMC Psychiatry**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12888-020-02553-9>

JAKUSZKOWIAK-WOJTEN, Katarzyna *et al.* Suicidality in treatment resistant depression: Perspective for ketamine use. **Psychiatria Danubina**, [s. l.], v. 31, p. S258–S260, 2019.

JIANG, Jiajun *et al.* A statistical analysis plan for a randomized clinical trial to evaluate the efficacy and safety of ethosuximide in patients with treatment-resistant depression. **Medicine (United States)**, [s. l.], v. 98, n. 31, p. 1–5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016674>

KADRIU, Bashkim *et al.* Glutamatergic Neurotransmission: Pathway to Developing Novel Rapid-Acting Antidepressant Treatments. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 119–135, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy094>

KANDEL, Eric et al. **Princípios de neurociências-5**. AMGH Editora, 2014.

KAVALALI, Ege T.; MONTEGGIA, Lisa M. Targeting Homeostatic Synaptic Plasticity for Treatment of Mood Disorders. **Neuron**, [s. l.], v. 106, n. 5, p. 715–726, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.05.015>

KELLY, Tammas F.; LIEBERMAN, Daniel Z. Long term augmentation with T3 in refractory major depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 115, n. 1–2, p. 230–233, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.09.022>

KENNEDY, S. H.; JOFFE, R. T. Pharmacological management of refractory depression. **Canadian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 451–456, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/070674378903400517>

KIM, J.S. Case report : Case report. **Canadian Family Physician**, [s. l.], v. 47, n. 10, p. 788–789, 2001.

KIM, Min-Ho; GOROUHI, Farzam; RAMIREZ, Sandra; *et al.* Catecholamine Stress Alters Neutrophil Trafficking and Impairs Wound Healing by β 2 -Adrenergic Receptor–Mediated Upregulation of IL-6. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 3, p. 809–817, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15366860>>. Acesso em: 3 Mar. 2021.

KIM, Y.-K., MAES, M., The role of the cytokine network in psychological stress. **Acta neuropsychiatr** v. 15, p. 148–155, 2003.

KIM, Yong-Ku, Kyoung-Sae Na b, *, Aye-Mu Myint c , Brian E. Leonard. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. V. 64, p. 277-284. 2016.

KÖNIG, F. *et al.* Trimipramine and maprotiline plasma levels during combined treatment with moclobemide in therapy-resistant depression. **Pharmacopsychiatry**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 125–127, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2007-979497>

KRANASTER, Laura *et al.* Reduced vascular endothelial growth factor levels in the cerebrospinal fluid in patients with treatment resistant major depression and the effects of electroconvulsive therapy—A pilot study. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 253, n. April, p. 449–453, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.04.080>

KRYST, Joanna; KAWALEC, Paweł; PILC, Andrzej. Efficacy and safety of intranasal esketamine for the treatment of major depressive disorder. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 9–20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1683161>

KRYSTAL, John H.; CHARNEY, Dennis S.; DUMAN, Ronald S. A New Rapid-Acting Antidepressant. **Cell**, [s. l.], v. 181, n. 1, p. 7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.033>

LACERDA, Acioly L.T. Esketamine/ketamine for treatment-resistant depression. **Brazilian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 579–580, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-0996>

LALLY, Níall *et al.* Neural correlates of change in major depressive disorder anhedonia following open-label ketamine. **Journal of Psychopharmacology**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 596–607, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0269881114568041>

LANZENBERGER, R. *et al.* Global decrease of serotonin-1A receptor binding after electroconvulsive therapy in major depression measured by PET. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 93–100, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mp.2012.93>

LAUTERBACH, Edward C. An extension of hypotheses regarding rapid-acting, treatment-refractory, and conventional antidepressant activity of dextromethorphan and dextrorphan. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 693–702, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.02.012>

LEE, Chi Wei *et al.* Ketamine ameliorates severe traumatic event-induced antidepressant-resistant depression in a rat model through ERK activation. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 93, n. September 2018, p. 102–113, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.03.015>

LIU, Weijian *et al.* Repeated intravenous infusions of ketamine: Neurocognition in patients with anxious and nonanxious treatment-resistant depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 259, n. May, p. 1–6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.08.012>

ŁOJKO, Dorota; RYBAKOWSKI, Janusz K. L-Thyroxine Augmentation of Serotonergic Antidepressants in Female Patients With Refractory Depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 103, n. 1–3, p. 253–256, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2007.01.016>

LUTZ, Pierre-Eric; KIEFFER, Brigitte L. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. **Cell Press Journal**. v. 36, n.3, p. 195-206. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.002>.

MANJI, Hussein K. *et al.* Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 707–742, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00117-3)

MARTINS, Ana Carolina C. L.; SILVA, Tarliane M.; GLORIA, M. Beatriz A., Determinação simultânea de precursores de serotonina - triptofano e 5-hidroxitriptofano - em café, **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 316–320, 2010.

MATHYS, Monica; MITCHELL, Brian G. Targeting treatment-resistant depression. **Journal of Pharmacy Practice**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 520–533, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0897190011426972>

MCINTYRE, Roger S. *et al.* The effect of intravenous, intranasal, and oral ketamine in mood disorders: A meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 276, n. April, p. 576–584, 2020a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.06.050>

MCINTYRE, Roger S. *et al.* The effectiveness of repeated intravenous ketamine on depressive symptoms, suicidal ideation and functional disability in adults with major depressive disorder and bipolar disorder: Results from the Canadian Rapid Treatment Center of Excellence. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 274, n. January, p. 903–910, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.05.088>

MERKL, Angela *et al.* Modulation of Beta-Band Activity in the Subgenual Anterior Cingulate Cortex during Emotional Empathy in Treatment-Resistant Depression. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 2626–2638, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv100>

MESTEK, A. *et al.* The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. **Journal of neuroscience**. v. 15, n. 3, p. 2396–2406. 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-02396.1995>.

MILANESI, Elena *et al.* The role of GRIK4 gene in treatment-resistant depression. **Genetics research**, [s. l.], v. 97, p. e14, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0016672315000142>

MILLER, Oliver H.; MORAN, Jacqueline T.; HALL, Benjamin J. Two cellular hypotheses explaining the initiation of ketamine's antidepressant actions: Direct inhibition and disinhibition. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 100, p. 17–26, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.028>

MINELLI, Alessandra *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) serum concentration during electroconvulsive therapy (ECT) in treatment resistant depressed patients. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 1322–1325, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.04.013>

MISKOWIAK, Kamilla W. *et al.* Effects of Erythropoietin on Hippocampal Volume and Memory in Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 270–277, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.013>

MOELLER, Sebastian *et al.* Vagus nerve stimulation as an adjunctive neurostimulation tool in treatment-resistant depression. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], v. 2019, n. 143, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/58264>

MONTIGNY, De Claude; ELIE, Robert; CAILLÉ, Giseles. Rapid response to the additional of lithium in iprindole-resistant unipolar depression: A pilot study. **American Journal of Psychiatry**. v. 142, n. 2, p. 220–223, 1985.

MUNARI, Leonardo *et al.* Brain histamine is crucial for selective serotonin reuptake inhibitors' behavioral and neurochemical effects. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 1–10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv045>

MURCK, Harald. Ketamine, magnesium and major depression - From pharmacology to pathophysiology and back. **Journal of Psychiatric Research**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 955–965, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.02.015>

MURROUGH, J. W. *et al.* Regulation of neural responses to emotion perception by ketamine in individuals with treatment-resistant major depressive disorder. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. e509-7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/tp.2015.10>

NAGELE, Peter *et al.* Nitrous oxide for treatment-resistant major depression: A proof-of-concept trial. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 10–18, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.016>

NEMEROFF, Charles B. Augmentation strategies in patients with refractory depression. **Depression and Anxiety**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 169–181, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6394\(1996\)4:4<169::AID-DA3>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6394(1996)4:4<169::AID-DA3>3.0.CO;2-A)

NIERENBERG, Andrew A; MCCALL, Rachel D. Depression. Management Options for Refractory Depression. **The American Journal of Medicine**. v. 101. 1996.

NODA, Y. *et al.* Neurobiological mechanisms of repetitive transcranial magnetic stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex in depression: A systematic review. **Psychological Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 16, p. 3411–3432, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0033291715001609>

NOLTE J. **The Human Brain: an Introduction to its Functional Anatomy**. Mosby-Year Book: Sydney. Ed. 5, p. 190-192, 2002.

O'LEARY, O. F. *et al.* Lithium augmentation of the effects of desipramine in a mouse model of treatment-resistant depression: A role for hippocampal cell proliferation. **Neuroscience**, [s. l.], v. 228, p. 36–46, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.072>

OKABE, Tadashi *et al.* Electroconvulsive stimulation (ECS) increases the expression of neuropeptide Y (NPY) in rat brains in a model of neuropathic pain: A quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) study. **Pain Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1460–1467, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2009.00678.x>

O'LEARY, Olivia F.; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Faster, better, stronger: Towards new antidepressant therapeutic strategies. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 753, p. 32–50, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.046>

ONTIVEROS, A.; FONTAINE, R.; ELIE, R. Refractory depression: the addition of lithium to fluoxetine or desipramine. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 188–192, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1991.tb05522.x>

OPAS, **Organização Pan-Americana da Saúde**. Depressão. 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/depressao>> acesso em 29 abril 2022

OPLER, Lewis A.; OPLER, Mark G.A.; ARNSTEN, Amy F.T. Ameliorating treatment-refractory depression with intranasal ketamine: Potential NMDA receptor actions in the pain circuitry representing mental anguish. *CNS Spectrums*, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 12–22, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1092852914000686>

PAŁUCHA-PONIEWIERA, Agnieszka; PILC, Andrzej. Glutamate-Based Drug Discovery for Novel Antidepressants. *Expert Opinion on Drug Discovery*, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 873–883, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1213234>

PAPAKOSTAS, G. I.; IONESCU, D. F. Towards new mechanisms: An update on therapeutics for treatment-resistant major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 1142–1150, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mp.2015.92>

PAPP, Mariusz *et al.* AMPA receptors mediate the pro-cognitive effects of electrical and optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex in antidepressant non-responsive Wistar-Kyoto rats. *Journal of Psychopharmacology*, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 1418–1430, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0269881120967857>

PAPP, Mariusz *et al.* The role of prefrontal cortex dopamine D2 and D3 receptors in the mechanism of action of venlafaxine and deep brain stimulation in animal models of treatment-responsive and treatment-resistant depression. *Journal of Psychopharmacology*, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 748–756, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0269881119827889>

PARDO, José V. *et al.* A preliminary study of resting brain metabolism in treatment-resistant depression before and after treatment with olanzapine-fluoxetine combination. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226486>

PASTUZYN, Elissa D. *et al.* The neuronal gene arc encodes a repurposed retrotransposon gag protein that mediates intercellular RNA transfer. *Cell*, v. 172, n. 1-2, p. 275-288. e18, 2018.

PERRY, Steve F. ; REID, Scott D. β -adrenergic signal transduction in fish: interactive effects of catecholamines and cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 11, n. 1-6, p. 195–203, 1993. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00004567>>. Acesso em: 3 Mar. 2021.

PHILLIPS, Jennifer L. *et al.* Single and repeated ketamine infusions for reduction of suicidal ideation in treatment-resistant depression. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 606–612, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0570-x>

PHILLIPS, Jennifer Lynne *et al.* Impact of monoamine-related gene polymorphisms on hippocampal volume in treatment-resistant depression. **Acta Neuropsychiatrica**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 353–361, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/neu.2015.25>

PITON, Amélie, *et al.* 20 ans après: a second mutation in MAOA identified by targeted high-throughput sequencing in a family with altered behavior and cognition. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 22 n.6, p. 776–783. 2014.

POPOVA, Vanina *et al.* Efficacy and safety of flexibly dosed esketamine nasal spray combined with a newly initiated oral antidepressant in treatment-resistant depression: A randomized double-blind active-controlled study. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 176, n. 6, p. 428–438, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2019.19020172>

PRICE, L. H.; CHARNEY, D. S.; HENINGER, G. R. Reserpine augmentation of desipramine in refractory depression: clinical and neurobiological effects. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 431–437, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00176473>

PRIEST, Robin. Therapy-resistant depression. **International Clinical Psychopharmacology**. v.7, n. 3-4, p. 2001-202. 1993.

RAPINESI, Chiara *et al.* Electroconvulsive therapy improves clinical manifestations of treatment-resistant depression without changing serum BDNF levels. **Psychiatry Research**, [s. l.], v. 227, n. 2–3, p. 171–178, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.04.009>

RITTMANNBERGER, Hans. Amisulpride as an augmentation agent in treatment resistant depression: A case series and review of the literature. **Psychiatria Danubina**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 148–156, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24869/psyd.2019.148>

ROSENBLAT, Joshua D., *et al.* Beyond Monoamines—Novel Targets for Treatment-Resistant Depression: A Comprehensive Review. **Current Neuropharmacology**. v13, n5. p636-655, 2015

RU-RONG, J. I. *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation activates specific regions in rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 26, p. 15635–15640, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15635>

SALLOUM, Naji C. *et al.* Efficacy of intravenous ketamine treatment in anxious versus nonanxious unipolar treatment-resistant depression. **Depression and Anxiety**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 235–243, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/da.22875>

SANACORA, Gerard *et al.* Increased cortical GABA concentrations in depressed patients receiving ECT. **American Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 160, n. 3, p. 577–579, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.3.577>

SANTOS, Marlene *et al.* FAS -670A>G genetic polymorphism Is associated with Treatment Resistant Depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 185, p. 164–169, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.06.027>

SARAIVA, Eduardo Marinho; FORTUNATO, J. M. Soares; GAVINA, Cristina. Oscilações do cortisol na depressão e sono/vigília. **Revista Portuguesa de Psicossomática**. v. 7, n. 1-2, p. 89-100. 2005.

SCHLAEPFER, Thomas E. *et al.* The hidden third: Improving outcome in treatment-resistant depression. **Journal of Psychopharmacology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 587–602, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/02698811111431748>

SCHOSSER, Alexandra *et al.* European Group for the Study of Resistant Depression (GSRD) - Where have we gone so far: Review of clinical and genetic findings. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 453–468, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.02.006>

SHERGILL, Sukhwinder S.; KATONA, Cornelius L.E. Pharmacological choices after one antidepressant fails: A survey of UK psychiatrists. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 19–25, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(96\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(96)00100-0)

SHIRAYAMA, Yukihiro *et al.* Effects of add-on tianeptine on treatment-resistant depression: An open-label pilot trial. **Acta Neuropsychiatrica**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 51–54, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/neu.2015.43>

SILBERBAUER, Leo *et al.* Oral Ketamine as a Treatment Option in Patients with Treatment Resistant Depression and Comorbid Arterial Hypertension. **Journal of Clinical Psychopharmacology**. v.40, n.4, p.418-420, 2020.

SINGH, Jaskaran B. *et al.* **Relapse prevention in treatment-resistant major depressive disorder with rapid-acting antidepressants**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2020. ISSN 15578925.v. 89 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2020.05.002>

SLUZEWSKA, A.; SOBIESKA, M.; RYBAKOWSKI, J.K. Changes in Acute-phase proteins during lithium potentiation of antidepressants in refractory depression. **Biological Psychiatry**. v.35, p.123-127. 1997.

SMITH, R.S. The macrophage theory of depression. **Med Hypotheses** v. 35, p. 298–306, 1991.

SOKOLSKI, Kenneth N. *et al.* Once-daily high-dose pindolol for SSRI-refractory depression. **Psychiatry Research**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 81–86, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2003.12.006>

SON, Se-Young *et al.* Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105 n. 15, p. 5739–5744. 2008.

SRIKUMAR, Bettadapura N. *et al.* Diminished responses to monoaminergic antidepressants but not ketamine in a mouse model for neuropsychiatric lupus. **Journal of Psychopharmacology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 25–36, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0269881118812102>

STAHL, Stephen M. Mechanism of action of ketamine. **CNS Spectrums**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 171–174, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S109285291300045X>

STAHN, C; BUTTGEREIT, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. **Nature Clinical Practice Rheumatology**. v. 4, n. 10, p.525-33. 2008.

STRAWBRIDGE, Rebecca *et al.* Inflammatory profiles of severe treatment-resistant depression. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 246, n. August 2018, p. 42–51, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.12.037>

SUKOFF RIZZO, S. J. *et al.* Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes. **Translational psychiatry**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. e199-12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/tp.2012.120>

SUN, Yinming *et al.* Magnetic seizure therapy reduces suicidal ideation and produces neuroplasticity in treatment-resistant depression. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0302-8>

SWAINSON, Jennifer *et al.* Esketamine for treatment resistant depression. **Expert Review of Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 899–911, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737175.2019.1640604>

SZYMKOWICZ, Sarah M.; FINNEGAN, Nora; DALE, Roman M. A 12-month naturalistic observation of three patients receiving repeat intravenous ketamine infusions for their treatment-resistant depression. **Journal of Affective Disorders**. v. 147, p. 416-420. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.10.015.A>

TAKAHASHI, Hitoshi *et al.* Addition of a dopamine agonist, cabergoline, to a serotonin-noradrenalin reuptake inhibitor, milnacipran as a therapeutic option in the treatment of refractory depression: Two case reports. **Clinical Neuropharmacology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 230–232, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00002826-200309000-00005>

TANUM, L. H. Combination treatment with antidepressants in refractory depression. **International Clinical Psychopharmacology**. v. 9, n. 2, p. 37-40. 1994

TARGUM, Steven D. et al. Letters to the editor. The TRH Test and Thyroid Hormone in Refractory Depression. **The American Journal of Psychiatry**. v. 141, n. 3, p. 463, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbm.820180112>

UCHIDA, Shusaku, *et al.* Epigenetic mechanisms of major depression: Targeting neuronal plasticity. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 72, n. 4, p. 212–227, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pcn.12621>>. Acesso em: Fev. 2021.

UINT, Luciana *et al.* Increased levels of plasma IL-1b and BDNF can predict resistant depression patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 361–369, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.3.361>

ULRICH-LAI, Yvonne; HERMAN, James. Neural Regulation of Endocrine and Autonomic Stress Responses. **Nature Reviews Neuroscience**. V.10, n. 6, p. 397-409, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4240627/>> Acesso em: Mai 2022.

VADODARIA, Krishna C. *et al.* Altered serotonergic circuitry in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 808–818, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0377-5>

VADODARIA, Krishna C. *et al.* Serotonin-induced hyperactivity in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 795–807, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0363-y>

VAN BAREN Nicolas, VAN DEN EYNDE Benoît J. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. **Front Immunol**. v.6, p.34. 2015. Disponível em: 10.3389/fimmu.2015.00034.

VERAART, Jolien K.E. *et al.* Oral S-ketamine effective after deep brain stimulation in severe treatment-resistant depression and extensive comorbidities. **BMJ Case Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 2020–2022, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bcr-2020-238135>

VERDONK, Franck *et al.* Microglial production of quinolinic acid as a target and a biomarker of the antidepressant effect of ketamine. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 81, n. April, p. 361–373, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.06.033>

VOGELZANGS, N. et al. Inflammatory and metabolic dysregulation and the 2-year course of depressive disorders in antidepressant users. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 7, p. 1624–1634, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/npp20149>>. Acesso em: Abr 2022

WANG, Liwei et al. The Fas–FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. **Nature Structural & Molecular Biology**. v. 17, p. 1324-1329. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1920>.

WEI, Yan; CHANG, Lijia; HASHIMOTO, Kenji. A historical review of antidepressant effects of ketamine and its enantiomers. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 190, n. January, p. 172870, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172870>

WOLKOWITZ, O. M.; REUS, V. I. Treatment of depression with antigluocorticoid drugs. **Psychosomatic Medicine**; v. 61, p. 698-711, 1999.

YANG, Chenghao *et al.* Inflammatory markers and treatment outcome in treatment resistant depression: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 257, p. 640–649, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.07.045>

YATHAM, Lakshmi N. *et al.* Effect of electroconvulsive therapy on brain 5-HT₂ receptors in major depression. **British Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 196, n. 6, p. 474–479, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.109.069567>

YEO, Giles S. *et al.* A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. **Nature neuroscience**, v. 7 n. 11, p. 1187–1189. 2004.

YOSHIMURA, Reiji *et al.* Comparison of the efficacy between paroxetine and sertraline augmented with aripiprazole in patients with refractory major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 355–357, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.07.008>

ZHANG, Yi *et al.* Dopamine receptor D2 and associated microRNAs are involved in stress susceptibility and resistance to escitalopram treatment. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1–10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv025>

ZHAO, Xiangxiang *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation increases serum brain-derived neurotrophic factor and decreases interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in elderly patients with refractory depression. **Journal of International Medical Research**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 1848–1855, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0300060518817417>

ZHENG, Wei *et al.* A preliminary study of adjunctive ketamine for treatment-resistant bipolar depression: ketamine and TRBD. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 275, p. 38–43, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.06.020>

ZHUO, Chuanjun *et al.* Effects of ketamine on circadian rhythm and synaptic homeostasis in patients with treatment-resistant depression: A protocol for mechanistic studies of its rapid and sustained antidepressant actions in humans. **Brain and Behavior**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/brb3.1423>

ZUSKY, Paul M. *et al.* Adjunct low dose lithium carbonate in treatment-resistant depression: a placebo-controlled study. **Journal Clin Psychopharmacol.** v.8, n. 2, p. 120-124, 1988.

WIEGERS, Thomas C. et al. Text mining and manual curation of chemical-gene-disease networks for the comparative toxicogenomics database (CTD). *BMC bioinformatics*, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2009.