



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
INSTITUTO BIOMÉDICO – IB
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

**ESTUDO DO PAPEL DE MICRORNAS EM INDIVÍDUOS COM DEPRESSÃO:
REVISÃO SISTEMÁTICA**

João Victor Vasconcelos de Sousa

**Rio de Janeiro
2018**

João Victor Vasconcelos de Sousa

**ESTUDO DO PAPEL DE MICRORNAS EM INDIVÍDUOS COM DEPRESSÃO:
REVISÃO SISTEMÁTICA**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro-UNIRIO como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Sarpa de Campos Mello

Rio de Janeiro
2018

João Victor Vasconcelos de Sousa

**ESTUDO DO PAPEL DE MICRORNAS EM INDIVÍDUOS COM DEPRESSÃO:
REVISÃO SISTEMÁTICA**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro-UNIRIO como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Sarpa de Campos Mello

Aprovado: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Sarpa de Campos Mello – UNIRIO / INCA

Profa. Dra. Priscila Tavares Guedes – UNIRIO

Dra. Bárbara Rodrigues Geraldino - Conprev / INCA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pois todas as coisas vêm dEle, existem por meio dEle e são para Ele. A Ele seja toda glória, a minha gratidão e o meu louvor por ter concluído este trabalho e o curso de Biomedicina.

Em segundo lugar, quero agradecer à minha família. Meu pai Antônio, minha mãe Sandra, meu irmão Pedro Henrique; são pessoas que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos de alegria, nos momentos de tristeza; pessoas fundamentais para minha formação como ser humano e meus avós: Joaquim, Nilza e Lúcia, por todo cuidado e amor que só encontrei em vocês.

Agradeço à minha companheira, namorada, melhor amiga Bárbara Patoléa por todo o carinho e amor, por proporcionar os melhores momentos da minha vida e pela parceria, dividindo todo o meu empenho, aflições e entusiasmo quanto ao meu trabalho e profissão.

À querida professora Márcia que sempre esteve disposta a ajudar, orientar e comprar brigas para que este trabalho fosse concluído da maneira mais exemplar possível. Sem ela, certamente, este trabalho não seria possível.

Aos meus queridos amigos e companheiros da maior instituição futebolística do Brasil, agradeço pelo suporte e incentivo desde o começo da faculdade até a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos ‘‘Maltrapilhos’’ pelo encorajamento para que este trabalho fosse o mais completo possível, pelo apoio e risadas nos momentos necessários.

A todos que se interessaram pelo estudo, como estava o andamento do mesmo e que queriam saber mais sobre só porque se importavam comigo.

À professora Priscila pelo apoio nesse projeto, por estar sempre pronta a ajudar no que for necessário e pelas conversas sobre o cenário profissional.

Ao professor Dante pelo apoio e torcida, por me arrastar pras aulas, por estar sempre disposto a ajudar e por sempre tentar resolver os problemas que eu levava dentro e fora de sala de aula.

Ao professor Marcello, que além de conduzir a disciplina de Parasitologia, foi um grande mestre dentro do âmbito acadêmico, mas também para questões de relacionamento interpessoal.

Aos meus colegas de faculdade, com os quais aprendo todos os dias, sendo apoiadores, e que fazem parte do meu dia-a-dia.

A todos os funcionários da UNIRIO que fizeram parte de um período muito importante e decisivo na minha vida.

À UNIRIO por ter me possibilitado cursar e concluir o curso de Biomedicina de forma gratuita e com qualidade.

“Melhor é o fim das coisas do que o princípio delas...”

Eclesiastes 7:8

RESUMO

A depressão pode ser classificada de diferentes formas, mas as duas principais formas são: distímia e depressão maior. Sendo a última a mais preocupante por haver a tentativa de suicídio associado a ela. A neuroquímica da depressão se dá por diversas hipóteses, a mais aceita e difundida é a da hipofunção das monoaminas. O uso de antidepressivos busca regular a concentração de monoaminas para a homeostasia interneuronal. Os microRNAs compõem um grupo de RNA pequenos não codificadores. Estes podem clivar o RNAm ou inibir sua tradução. Diversos miRNAs são expressos no SNC, estando envolvidos na homeostasia ou patogénia da depressão. Microvesículas são pequenas vesículas que podem ter origem de vários tipos de células por brotamento de membrana plasmática ou por formação de um corpo multivesicular (MVB). Os exossomos derivam dos MVB, estes transitam para a superfície celular, se fundem com a membrana plasmática e liberam as vesículas intraluminais para o meio extracelular. Os exossomos podem também carrear ácidos nucleicos, tais como, RNA mensageiro (RNAm) e microRNA (miRNA) para as células próximas ou distantes da célula doadora. Estudos demonstram que é possível isolar exossomos de tecidos biológicos ou fluidos, ponto central para a interação entre miRNA e o seu RNAm alvo no laboratório. O objetivo deste trabalho foi analisar o papel dos miRNAs derivados de exossomos na biologia da depressão por meio de uma revisão sistemática da literatura. As palavras buscadas nas bases de dados *PubMed*, *Medline* e *BVS* foram "*microRNA*", "*exosome*" e "*depression*". De acordo com os critérios de inclusão e exclusão, de 352 estudos, 4 foram utilizados para realizar a revisão. Nos resultados, 45 microRNAs estavam com expressão aumentada (n=23) ou diminuída (n=22) e cujos métodos de análise foram qRT-PCR e *Microarray* a partir de fluidos biológicos vivos (sangue ou LCR) ou de tecidos *post-mortem*. Estes 45 microRNAs desempenham papéis na regulação de genes associados a processos de apoptose, neurogênese, receptor de catecolaminas, diferenciação celular, controle de expressão gênica e desenvolvimento vascular; processos que são essenciais para o desenvolvimento ou não da depressão. O uso de microRNA derivados de exossomos pode se dar como uma forma de diagnóstico ou prognóstico e para realizar o acompanhamento da progressão ou não da depressão. A capacidade de prever a resposta ao tratamento com base na expressão de biomarcadores confere vantagem clínica em termos de escolha da estratégia terapêutica correta para o paciente. MicroRNAs derivados de exossomos devem continuar sendo um foco significativo no desenvolvimento de novos tratamentos antidepressivos. Essas medidas permitiriam tratamentos direcionados ao paciente e reduziriam os efeitos negativos fora do alvo.

Palavras-chave: Depressão, microRNA, exossomos, biomarcador.

ABSTRACT

Depression can be classified in different ways, but the two main forms are: dysthymia and major depression. The latter being the most worrisome to have the attempted suicide associated with it. The neurochemistry of depression occurs by several hypotheses, the most accepted and widespread is the hypofunction of monoamines. The use of antidepressants seeks to regulate the concentration of monoamines for interneuronal homeostasis. MicroRNAs make up a small group of non-coding RNAs. These may cleave the mRNA or inhibit its translation. Several miRNAs are expressed in the CNS, being involved in the homeostasis or pathogenesis of depression. Microvesicles are small vesicles that may originate from various cell types by plasma membrane budding or by formation of a multivesicular body (MVB). The exosomes are derived from the MVB, they travel to the cell surface, fuse with the plasma membrane and release the intraluminal vesicles into the extracellular medium. Exosomes can also carry nucleic acids, such as messenger RNA (mRNA) and microRNA (miRNA) to cells near or far from the donor cell. Studies demonstrate that it is possible to isolate exosomes from biological tissues or fluids, central point for the interaction between miRNA and its target mRNA in the laboratory. The objective of this work was to analyze the role of miRNAs derived from exosomes in the biology of depression by means of a review systematic literature. The words searched in the PubMed, Medline and VHL databases were "microRNA", "exosome" and "depression". According to the inclusion and exclusion criteria, of 352 studies, 4 were used to perform the review. In the results, 45 microRNAs were either increased (n = 23) or decreased (n = 22) expression and whose methods of analysis were qRT-PCR and Microarray from living biological fluids (blood or CSF) or postmortem tissues. These 45 microRNAs play roles in regulating genes associated with apoptosis, neurogenesis, catecholamine receptor, cell differentiation, gene expression control, and vascular development; processes that are essential for the development or not of depression. The use of microRNAs derived from exosomes can be given as a form of diagnosis or prognosis and to monitor the progression or not of depression. The ability to predict response to treatment based on the expression of biomarkers confers clinical advantage in terms of choosing the correct therapeutic strategy for the patient. MicroRNAs derived from exosomes should continue to be a significant focus in the development of novel antidepressant treatments. These measures would allow patient-directed treatments and reduce negative effects outside the target.

Key-words: Depression, microRNA, exosome, biomarker.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina ou serotonina
ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BACE1	<i>β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
Ca⁺²	Cálcio
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRH	Hormônio liberador de Corticotrofina
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
EV	<i>Extracellular vesicle</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Gs	Proteína G (estimulatória) do subtipo s
Gq	Proteína G (estimulatória) do subtipo q
Hrs	<i>Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate</i>
ILV	<i>Intraluminal vesicle</i>
IMAO	Inibidor da monoamina oxidase
IP₃	Inositol trifosfato
ISRS	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MAO	Monoamina oxidase
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1β	<i>Macrophage Inflammatory Proteins</i>
miR-000	microRNA número 000
miRNA	MicroRNA
MV	Microvesícula
NE	Norepinefrina ou Noradrenalina
NMDA	N-metil D-Aspartato
P2RX7	<i>P2X purinoceptor 7</i>
PABPC1	Proteína de ligação a poliadenilato 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI₃P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PM	<i>Post-mortem</i>
PS	Fosfatidilserina

qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RAB	Membro da superfamília Ras de proteínas G monoméricas
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
SLC17A1	<i>Sodium-dependent phosphate transport protein 1</i>
SC35	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 35</i>
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
TF	Fator tecidual
UTR	<i>Untranslated region</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação mecanismo e sua respectiva descrição dentro do contexto da depressão	4
Tabela 2	Regulação de microRNA envolvidos na depressão	24
Tabela 3	Relação microRNA e sua respectiva função	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema simplificado e representativo da hipótese das monoaminas.	5
Figura 2	Diagrama simplificado mostrando mecanismos que se acredita estarem envolvidos na fisiopatologia da depressão relacionados ao estresse.	6
Figura 3	Esquema simplificado e representativo do processo de biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs.	8
Figura 4	Papel de miRNA na regulação do desenvolvimento das células do SNC.	9
Figura 5	Esquema simplificado e representativo do papel do miR-206 na doença de Alzheimer.	10
Figura 6	Esquema simplificado e representativo do processo de biogênese e secreção de exossomos.	15
Figura 7	Composição de exossomos.	16
Figura 8	Esquema simplificado e representativo do processo de interação “exossomo – célula”.	17
Figura 9	Fluxograma do processo de revisão sistemática utilizado.	22
Figura 10	Diferença representativa dos métodos de análise usados.	23
Figura 11	Esquema simplificado e representativo de biomarcador baseado em microRNA derivados de exossomos em indivíduos vivos.	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1 Depressão	2
2.1.1 Definição e classificação	2
2.1.2 Neuroquímica da depressão	3
2.1.3 Fármacos utilizados na depressão	6
2.2 MicroRNAs	7
2.2.1 MicroRNAs em doenças do SNC	9
2.3 Microvesículas	10
2.3.1 Breve Histórico	11
2.3.2 Biogênese e Secreção das microvesículas	12
2.3.3 Exossomos	13
2.3.4 Composição	15
2.3.5 Interação Exossomo - Célula	17
2.3.6 Isolamento e Detecção	18
2.4 Justificativa	20
3. DESENVOLVIMENTO	20
3.1 OBJETIVOS	20
3.1.1 Objetivo Geral	20
3.1.2 Objetivos Específicos	20
3.2 METODOLOGIA	21
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
3.3.1 MicroRNAs com expressão alterada na Depressão	22
3.3.2 MicroRNAs e sua importância funcional na Depressão	25
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

A depressão tem sido uma doença cada vez mais estudada e debatida nos dias atuais dentro do contexto pessoal e social (De Choudhury et al., 2013). Um exemplo dessa perfusão do debate acerca de depressão e seus desdobramentos seria o Setembro Amarelo; tal campanha visa alertar a sociedade sobre os cuidados necessários a serem tomados relacionados à qualidade de vida e prevenção do suicídio (De Oliveira et al., 2017). A depressão maior caracteriza-se pelo seu sintoma mais grave que seria a tentativa de suicídio, por isso a atenção e maior necessidade de debates e estudos que busquem impedir tal acontecimento (American Psychiatric Association, 2013).

Uma vez que depressão é uma doença cujo prognóstico é positivo, além de um controle dos possíveis fatores associados e ainda muito pouco entendido. As análises moleculares são extremamente valiosas para identificar os mecanismos de gênese da depressão, seu desenvolvimento bem como biomarcadores e vias moleculares potencialmente úteis para o desenvolvimento de terapias mais eficazes (Schmidt et al., 2011).

Biomarcadores são moléculas que auxiliam o identificar quais tratamentos funcionam melhor para aquele tipo específico de doença (Strimbu e Tavel, 2010). Estes são importantes no contexto da depressão, pois o diagnóstico e prognóstico da depressão é feito baseado na sintomatologia do paciente; não há métodos bioquímicos ou moleculares que poderiam ser mais precisos e eficazes para o paciente (Crystal et al., 2003; Feighner et al., 2012).

O presente trabalho busca propor inicialmente que microRNAs (RNA pequenos não codificadores) possam vir a ser mais estudados e avaliar o impacto de miRNA na biologia da depressão (MacFarlane e Paul, 2010). Tais microRNAs podem ser identificados a partir de exossomos encontrados em fluidos corporais, por exemplo, sangue (Vlassov et al., 2012).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Depressão

2.1.1 Definição e classificação

A depressão pode apresentar diferentes definições. Suas definições se baseiam de acordo com a natureza de sua análise. Pode ser definida como um transtorno de humor, um distúrbio afetivo juntamente com distúrbios bipolares. Os distúrbios afetivos correspondem a um grupo de condições mentais caracterizadas fundamentalmente por alterações de humor. Pode ser considerada uma doença heterogênea que pode resultar da disfunção de vários sistemas neurotransmissores ou metabólicos do ponto de vista molecular. Pode ocorrer como uma desordem moderada ou como um sintoma de outras doenças psiquiátricas ou médicas (Bunney e Davis, 1965; Montgomery e Åseberg, 1979; Hillhouse e Porter, 2015; World Health Organization, 2017)

A Depressão ou Transtorno Depressivo é classificada de diferentes formas, embora os dois principais tipos são distímia ou transtorno distímico e depressão maior ou transtorno depressivo maior.

A Distímia ou Transtorno Distímico caracteriza-se por um transtorno de humor depressivo crônico e persistente, mas leve. Muitas vezes, é difícil diferenciá-la da depressão maior, especificamente em seu estado parcialmente remitido porque a “perda de interesse” ou “apatia” tende a prevalecer tanto na distímia quanto na depressão remitida (Williams Jr et al., 2000). É acompanhada por, pelo menos, dois dos seguintes sintomas: falta de apetite ou comer, demais insônia ou hipersonia, baixa energia ou fadiga, baixa autoestima, baixa concentração ou dificuldade de tomar decisões, sentimentos de desesperança (American Psychiatric Association, 2013).

A Depressão Maior ou Transtorno Depressivo Maior trata-se de um transtorno cujas características principais são o humor deprimido ou triste, preocupação pessimista, diminuição pelos interesses normais, irritabilidade, acompanhado de mudanças somáticas e cognitivas que podem alterar negativamente a capacidade da pessoa de funcionar. Pode vir a ocorrer um episódio, no entanto, é uma condição recorrente (American Psychiatric Association, 2013).

O fato de a depressão ser subdiagnosticada é preocupante devido ao risco intrínseco de suicídio associado à depressão. Cerca de 20% das pessoas com depressão maior tentam suicídio em algum momento (Suominen et al., 1998; Barbosa et al., 2011; Cipriani et al., 2005). Então, é importante que os sintomas e diagnóstico da depressão sejam reconhecidos e tratados em tempo hábil. No mais, a resposta ao tratamento deve ser analisada tais quais as decisões tomadas no que se refere ao tratamento com o fármaco inicial, ajuste e medicação alternativa não farmacológica.

2.1.2 Neuroquímica da depressão

Os últimos 50 anos testemunharam uma diversidade de teorias, cada uma afirmando ter a chave para a etiologia da depressão, baseada na perspectiva estreita de sua própria disciplina (genética, social, psicológica ou bioquímica). No entanto, na última década, graças aos avanços tecnológicos, grandes avanços foram feitos em nossa compreensão do funcionamento do cérebro, particularmente, sua significativa capacidade de plasticidade na interação com o ambiente (físico e psicológico). Tornou-se cada vez mais claro que os fatores psicossociais e biológicos são altamente relevantes e, longe de se contradizerem, estão inextricavelmente ligados à gênese dessa condição multifacetada (Gillen et al., 2001; Bhagwagar et al., 2004).

A introdução dos primeiros antidepressivos eficazes no final da década de 1950 estimulou o interesse pela neuroquímica do cérebro e, em particular, pelos sistemas de neurotransmissores (Manji et al., 2001). Entender o mecanismo de ação dos antidepressivos poderia abrir caminho para o entendimento da patogênese da depressão. A teoria mais antiga a surgir, que sobrevive até o presente, a “hipótese da monoamina de depressão”, postulou que a depressão é causada por uma deficiência do monoaminas, noradrenalina, serotonina e dopamina, no cérebro, e que os medicamentos antidepressivos restaurar estes ao normal (Figura 1) (Hirschfeld et al, 2000; Hindmarch, 2002; Raison, 2009).

A hipofunção das monoaminas possuem ramificações com diversos mecanismos de acordo com estudos baseados nos efeitos farmacológicos de fármacos que causavam ou aliviavam os sintomas de depressão, dos quais estão destacados na tabela seguinte (Tabela 1).

Tabela 1: Relação mecanismo e sua respectiva descrição dentro do contexto da depressão. Alguns mecanismos descritos na literatura relacionam algumas alterações de biossinalização que caracterizam a hipofunção das monoamidas, sendo esta a principal hipótese a elucidar a patogênese da depressão.

Mecanismo	Descrição
Deficiência na dieta dos aminoácidos (triptofano e tirosina) (Wurtman et al., 1980)	Triptofano e tirosina são precursores de alguns neurotransmissores essenciais para a fisiologia neural, tais quais: dopamina, serotonina e noradrenalina.
Mutações na triptofano-hidroxilase e tirosina-hidroxilase (Neumeister et al., 2003)	Mutações nos genes que codificam enzimas de síntese de neurotransmissores pode acarretar o desequilíbrio neural.
Excesso de ativação da enzima mitocondrial monoamino-oxidase (MAO) (Meyer et al., 2006)	Excesso de ativação das enzimas de degradação dos neurotransmissores, como a enzima mitocondrial monoamino-oxidase (MAO), enzima que metaboliza as monoaminas.
Aumento da atividade de receptores de recaptção em neurônios pré-sinápticos (Elder et al., 2011)	Aumento da atividade de receptação pelos transportadores na membrana do neurônio pré-sináptico impossibilita que os receptores pós-sinápticos sejam ativados.
Alterações na via de sinalização de CREB e alteração no padrão de sinalização da PKA (Kameyama et al., 1998; Blendy et al., 2006).	Alterações na via do fator de transcrição CREB e atuação da PKA que podem alterar a transcrição de genes do neurônio (como BDNF) e, conseqüentemente, modificar sua forma, fazendo com que tenha menor capacidade de conectividade cerebral e neuroproteção;
Modificações serotoninérgicas (Cheetham et al., 1990; Yates et al., 1992;	Alterações da expressão de receptores de serotonina 5HT _{1A} e 5HT ₂ que acarretam em deficiências na neurotransmissão mediada por 5HT _{1A} (sua diminuição) e excesso de receptores 5HT ₂

O excesso de neurotransmissão por 5HT₂ na amígdala e no córtex cerebral parece estar relacionado com neurodegeneração e depressão devido a repercussão emocional exacerbada a estímulos aversivos, além do excesso desses receptores na amígdala acarretar em diminuição da liberação de dopamina no circuito de recompensa. (Nestler e Carlezon, 2006; Howell e Cunningham, 2015).

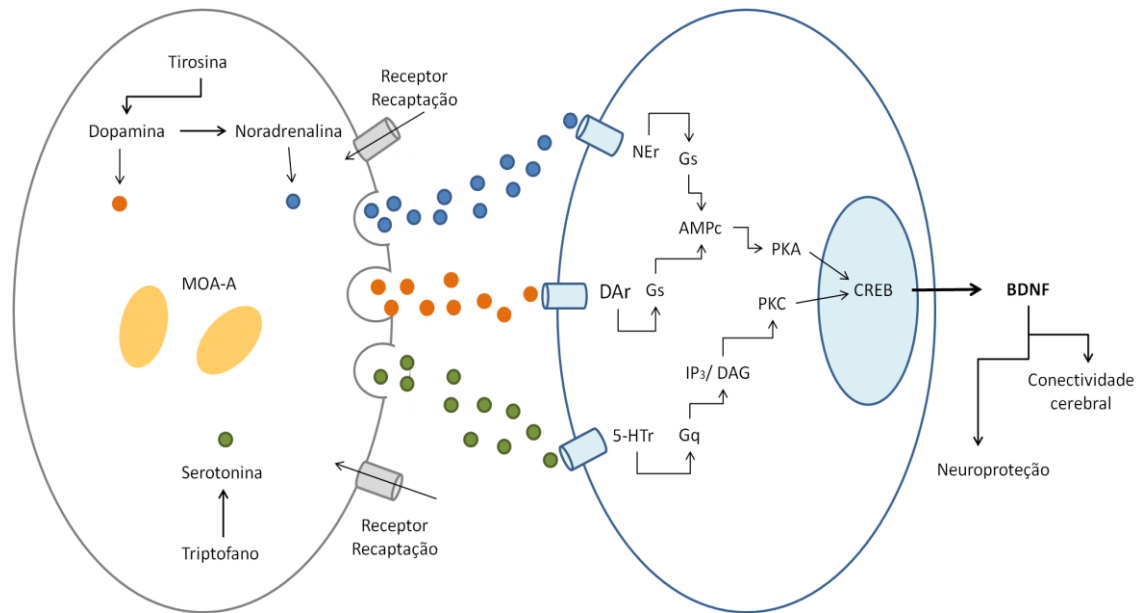


Figura 1: Esquema simplificado e representativo da hipótese das monoaminas. A depressão parece estar associada a alterações nas sinalizações da serotonina, noradrenalina e dopamina. Estas estão associadas à proteínas Gq, Gs e Gs, respectivamente, que seguem seus caminhos de bio-sinalização para o fator de transcrição CREB que está relacionado à regulação de BDNF que estimula neuroproteção e aumenta a conectividade cerebral. Acervo pessoal.

O estresse/cortisol também pode estar envolvido nesses processos de deflagração de sintomas neuroquímicos da depressão (Burke et al., 2005). O estresse e o excesso de cortisol crônico têm sido considerados como raízes etiológicas da depressão, como disparadores do processo depressivo (Figura 2). O estresse pode favorecer a ativação de glutamato através de seus receptores NMDA, a ativação destes receptores está relacionada a apoptose neuronal e a inibição da neurogênese (Zarate et al., 2006). Enquanto que a exposição crônica ao cortisol pode desencadear a disfunção e morte dos neurônios do hipocampo e córtex cerebral, resultando na diminuição do hipocampo pela

diminuição da liberação de BDNF e neurônios com acentuada diminuição das espículas dendríticas devido ao estresse crônico presente (Burke et al., 2005; Huys et al., 2015).

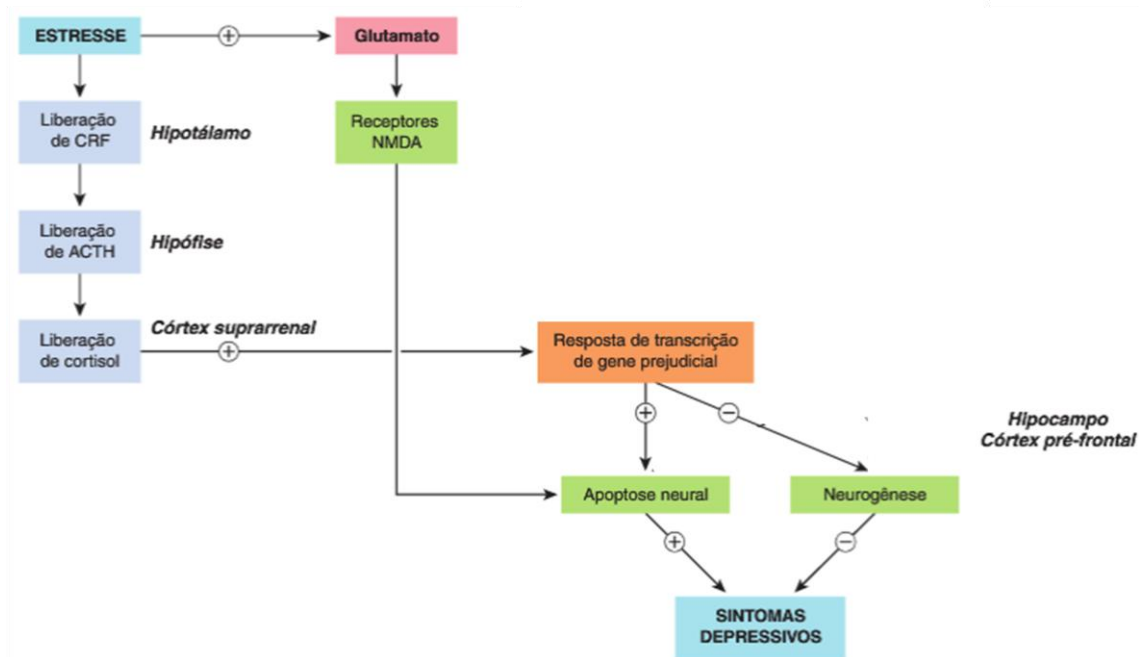


Figura 2: Diagrama simplificado mostrando mecanismos que se acredita estarem envolvidos na fisiopatologia da depressão relacionados ao estresse. As principais vias pró-depressivas envolvem o eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal, que é ativado pelo estresse e, por sua vez, potencializa a ação excitotóxica do glutamato, mediada pelos receptores NMDA e altera a expressão de genes que promovem apoptose neural no hipocampo e córtex pré-frontal. Adaptado de Rang et al., 2012.

2.1.3 Fármacos utilizados na depressão

Por tratar-se de uma síndrome complexa de gravidade variável, o tratamento da depressão baseia-se num grupo diverso de agentes terapêuticos antidepressivos. Estes podem ser: antidepressivos tricíclicos (ADTs), inibidores da monoaminoxidase (IMAO), inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e atípicos.

Os Antidepressivos Tricíclicos tem como mecanismo de ação o bloqueio da recaptura de monoaminas, tais como, norepinefrina (NE), serotonina (5-HT) e, em menor proporção, dopamina (DA). Devido ao bloqueio da recaptção de monoaminas, ocorre um aumento da disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica, levando ao aumento da ativação dos receptores pós-sinápticos. Alguns efeitos adversos são observados devido a sua estrutura tricíclica. Eles podem inibir receptores de histamina H₁ e muscarínicos, causando sonolência. O bloqueio excessivo de H₁ pode

também favorecer a obesidade e bloqueio excessivo de M_1 altera motilidade intestinal (constipação), borramento visual, ressecamento das mucosas, delírio e alucinações. Além disso, o bloqueio de canais de cálcio voltagem dependentes pode causar arritmias cardíacas e queda de pressão ortostática (Keer et al., 2001; Arroll et al., 2016).

Os Inibidores da monoaminoxidase (IMAO) possuem como mecanismo de ação impedir a degradação (oxidação) de catecolaminas recaptadas e não recicladas via monoaminoxidase. Porém o excesso de NE e 5-HT na fenda sináptica causa agitação, comportamento maníaco, alucinações, confusão mental, neuropatia periférica, ganho de peso, lesão hepática, cefaleia, fadiga, boca seca, retardo na ejaculação, lesão hepática e outras reações adversas (Segraves e Balon, 2014; Arroll et al., 2016).

Os Inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) são fármacos que inibem o transportador de recaptção de serotonina, o que leva a um aumento de serotonina nas fendas sinápticas, ativando mais receptores 5-HT_{1A} em regiões corticais, o que caracteriza o efeito terapêutico antidepressivo. Em função de sua ação mais seletiva, influencia também a quantidade de serotonina disponível para se ligar em outros receptores de serotonina. Portanto, seu abuso pode causar irritabilidade, insônia e disfunção sexual, perda de libido e retardo na ejaculação (pelo excesso de receptores 5-HT₂ na região límbica, especialmente amígdala), náuseas e vômitos (ativação de receptores 5-HT₃ no centro do vômito) (Cascade et al., 2009; Arroll et al., 2016).

Os Antidepressivos Atípicos são fármacos que não se enquadram em nenhuma das classes supracitadas. Alguns desta classe podem vir a aumentar a transmissão de noradrenalina no SNC, podem regular a interação da serotonina com seus receptores. Outros inibem a recaptção de serotonina e noradrenalina. Seus efeitos adversos irão variar de acordo com seu mecanismo de ação específico para cada fármaco (Horst e Preskorn, 1998; Al-Ruthia et al., 2015).

2.2 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) compõe um grupo de RNA pequenos (aproximadamente 20-25 nucleotídeos) não codificadores, estes possuem uma capacidade de inibir o processo de tradução dependendo do grau de interação com seu RNAm. Os miRNAs se ligam à região 3' não traduzida (3'UTR- *untranslated region*) e, com isso, ocorre a degradação ou inibição da tradução (MacFarlane e Paul, 2010; Wilson e Doudna, 2013).

A biogênese do miRNA tem ponto inicial a ação da RNA polimerase II sobre o gene de miRNA dando origem a um transcrito primário (pri-miRNA). Este sofre processamento enzimático da RNaseIII nuclear (Drosha) havendo formação de uma estrutura em “grampo”, denominada de miRNA precursor (pre-miRNA). O pre-miRNA é transportado pela exportina-5 para o citoplasma, onde, sofre ação enzimática da RNase III citoplasmática (Dicer) que cliva a porção do grampo gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 20-25 nucleotídeos de tamanho. O complexo protéico (miRNP) incorpora a fita simples de miRNA gerada, sendo o miRNA o guia do complexo proteico miRNP aos sítios complementares localizados nas regiões 3’ UTR (*untranslatedregion*) de RNA mensageiros (RNAm) alvos (Rupaimoole e Slack, 2017; McGeary et al., 2018)

A interação entre miRNA e o seu RNAm alvo determina a forma de atuação do miRNA, uma vez que a complementaridade total ocasiona clivagem do RNAm e uma complementaridade parcial ocasiona apenas uma inibição da tradução do RNAm alvo específico, sendo esse último o mecanismo mais recorrente (MacFarlane e Paul, 2010) (Figura 3).

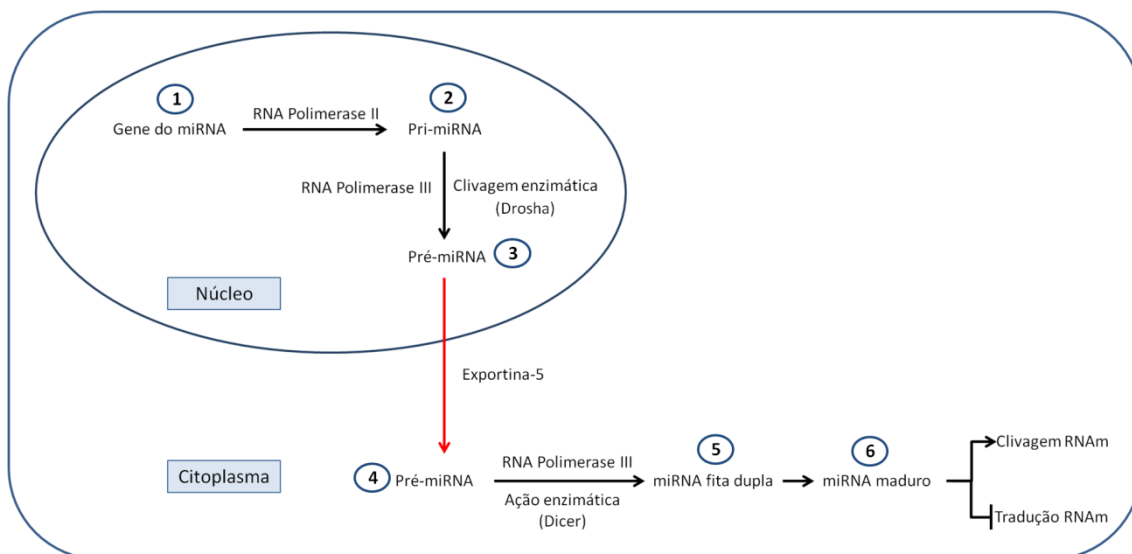


Figura 3: Esquema simplificado e representativo do processo de biogênese e mecanismos de ação dos miRNAs. No núcleo, os pri-microRNAs (pri-miRNA) sofrem clivagem enzimática, gerando o pré-miRNA e são exportados para o citoplasma, onde o processamento dos miRNAs se completa a fim de que a clivagem ou inibição da tradução de RNA mensageiros alvo ocorra como mecanismo de regulação pós-transcricional. Acervo pessoal.

2.2.1 MicroRNAs em doenças do SNC

Diversos miRNAs são expressos no Sistema Nervoso Central (SNC), em especial, no cérebro e muitos são específicos para os neurônios (Schratt et al., 2006). As mutações no mecanismo de processamento desses miRNAs são, recorrentemente, encontradas em vários distúrbios neurológicos (Fiore et al., 2008). Um número crescente de miRNAs e seus alvos foram encontrados envolvidos na regulação do desenvolvimento cerebral e neuronal (Figura 4) (Petri et al., 2014; Hernandez-Rapp et al., 2017; Miguel-Hidalgo et al., 2017).

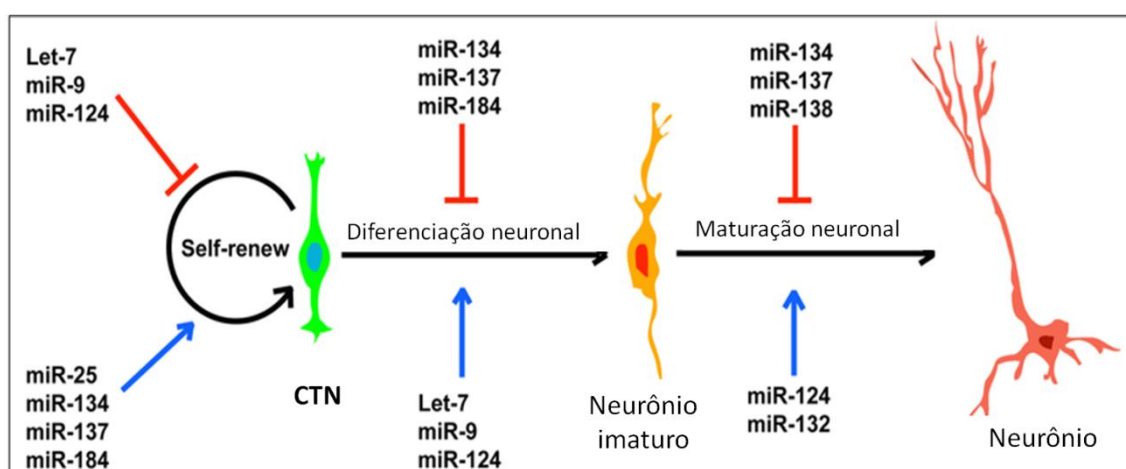


Figura 4: Papel de miRNA na regulação do desenvolvimento das células do SNC. Alguns miRNAs tem papel para a propagação da diferenciação e maturação de células nervosas (ex.: miR-124), enquanto alguns inibem esses processos (ex.: miR-134). CTN = célula-tronco neural. Adaptado de Meza-Sosa et al., 2014.

Diversos miRNAs específicos do cérebro ou em maior expressão no cérebro foram identificados e caracterizados. O miR-134 para o cérebro foi estudado na neurogênese (Meza-Sosa et al., 2014), têm sido relatados outros miRNAs no sistema nervoso mais do que em qualquer outro tecido, e estão envolvidos em diferentes aspectos do desenvolvimento neural (Kocerha et al., 2015). A alta expressão desses miRNAs é capaz de inibir a diferenciação neuronal e características morfológicas (Bavamian et al., 2015) e também pode ser associado ao desenvolvimento cerebral anormal e à patogênese de várias doenças neurológicas tais como doença de Alzheimer (Figura 6), doença de Parkinson, depressão, entre outras (Maes et al., 2009; Smalheiser et al., 2012; Wong e Nass, 2013).

Por exemplo, alta expressão de miR-206 encontrada no córtex temporal de pacientes com doença de Alzheimer, pode regular negativamente (inibe a transcrição) o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o que favorece a neurodegeneração, a disfunção sináptica, o que acarreta e agrava os prejuízos relacionados a memória; mesmo em alterações patológicas extremamente precoces (Figura 5) (Moon et al., 2016).

A avaliação da expressão de miRNA em distúrbios do sistema nervoso fornece novas informações moleculares e introduz a possibilidade de que a expressão ou inibição de miRNAs específicos possam ajudar no manejo clínico dos processos da doença, sendo considerada uma via potencial para o desenvolvimento de biomarcadores periféricos (Sheinerman et al., 2013).

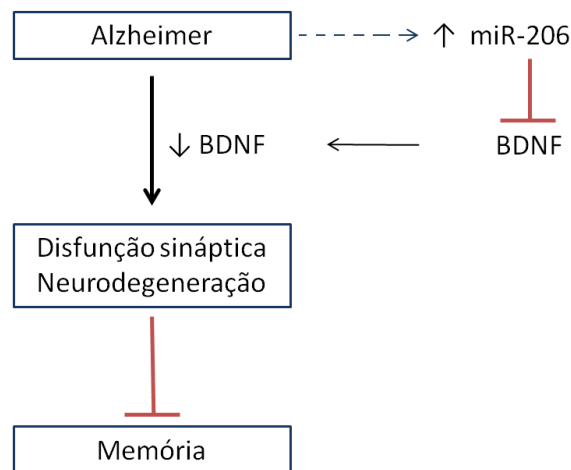


Figura 5: Esquema simplificado e representativo do papel do miR-206 na doença de Alzheimer. A doença se caracteriza pelo aumento do miR-206, este por sua vez, regula negativamente o BDNF que irá contribuir para disfunção sináptica e neurodegeneração, prejudicando ainda mais a memória. Adaptado de Moon et al., 2016.

2.3 Microvesículas

Microvesículas (MV) são pequenas vesículas que podem ter origem de vários tipos de células por brotamento de membrana plasmática ou formação de um corpo multivesicular (MVB) e apresentam tamanho heterogêneo (Tricarico et al., 2018). Dentro da literatura científica, as microvesículas também têm sido referidas como

vesículas extracelulares, exossomos, oncosomos, corpos apoptóticos (György et al., 2011), que se desprendem em micropartículas de membrana.

As microvesículas são capazes de modificar o meio extracelular, as células receptoras proximais e distais (Fleissner et al., 2012). No mais, a identificação de microvesículas em diversos fluidos corporais (Camussi et al., 2010) ampliou o interesse em pesquisas que visam entender e elucidar suas funções em tecidos saudáveis e doentes. Concomitantemente, com os avanços recentes nas técnicas de isolamento de microvesículas a partir de fluidos corporais periféricos (Momen-Heravi et al., 2013) como sangue e urina, é sugerido que as microvesículas podem executar um papel essencial em futuras estratégias diagnósticas e terapêuticas, e assim torná-las um importante objeto de estudo da pesquisa biomédica (Skog et al., 2010).

2.3.1 Breve Histórico

Na década de 1940, Erwin Chargaff e Randolph West, ao realizarem diversos experimentos, descobriram que o plasma livre de plaquetas detinha propriedades de coagulação, que continham um fator precipitável que facilitava a geração de trombina e consequente formação de fibrina. Este trabalho concluiu que o plasma humano possui um componente da coagulação que é sedimentado em forma de *pellet* devido a uma alta velocidade de centrifugação (Chargaff e West, 1946).

Entretanto, apenas anos depois, em 1967, graças aos avanços tecnológicos alcançados, como a microscopia eletrônica, que o pesquisador Peter Wolf, através de uma série de experimentos com amostras de sangue, foi capaz de demonstrar que este componente da coagulação, obtido por ultracentrifugações de plasma livre, tratava-se, na verdade, de pequenas vesículas oriundas da membrana celular de plaquetas ativadas. "Poeira de plaquetas" foi o termo cunhado por Peter Wolf para descrever o material coagulante subcelular que ele observou (Wolf, 1967).

Wolf concluiu que a "poeira de plaquetas" obtida a partir do plasma sérico e citratado possuía propriedades de coagulação idênticas ao Fator III de coagulação, também conhecido como fator de tecido ou fator tecidual (*'tissue factor'*, TF) de plaquetas, um fator de coagulação derivado de plaquetas, responsável pela conversão da protrombina em sua forma ativa, a trombina (Graf e Wolfran, 2018).

Com isso, Peter Wolf revolucionou a literatura da coagulação sanguínea com a descoberta da "poeira de plaquetas", que foi subsequentemente substituído pelo termo micropartículas.

No ano de 1971, Crawford também descobriu que as micropartículas possuem atividade de ATPase similar às proteínas contráteis plaquetárias, como a trombostenina e, descobriu que suas amostras de micropartículas continham lipídios que contribuía para a fração livre de serotonina do plasma com sua capacidade de abrigar o neurotransmissor (Crawford, 1971).

O fator tecidual é uma proteína transmembrana capaz de formar um complexo com o fator VII / VIIa, levando à geração de trombina (Ferreira et al., 2010). Após estudos demonstrarem de que as células tumorais liberam vesículas microvesículas (Iero et al., 2008), relatou-se que microvesículas podem ser obtidas de células tumorais por ultracentrifugação (Dvorak et al., 1983).

2.3.2 Biogênese e Secreção das microvesículas

O processo de formação e liberação de microvesículas (MV), dentro do exposto na literatura, traz um retrato comparativo quanto aos exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, uma vez que estes são caracterizados e denominados de vesículas extracelulares (D'Souza-Schorey e Schorey, 2018).

As vesículas extracelulares diferenciam-se em seus mecanismos de geração, tamanho e sítio de geração. Os exossomos são formados, primeiramente, como vesículas intraluminais (ILV) dentro de um corpo multivesicular (MVB) que é liberado no espaço extracelular após a fusão do MVB com a membrana plasmática (Colombo et al., 2014). Quanto à biogênese das microvesículas, também chamadas como ectossomos ou micropartículas, são observadas alterações como a exposição da fosfatidilserina (PS) na superfície externa da membrana plasmática e a liberação das MV ocorre devido à degradação do citoesqueleto através de proteólise dependente de cálcio (Hugel et al., 2005; Prudent et al., 2015). Já corpos apoptóticos possuem tamanho que varia entre 1-5µM são formados durante a formação de bolhas celulares e fragmentação após a morte celular deflagrada por apoptose (Atkin-Smith et al., 2015).

Este trabalho concentrou-se em abordar detalhadamente a biogênese e liberação de exossomos.

2.3.3 Exossomos

A biogênese dos exossomos começa dentro do sistema endossomal. A invaginação da membrana plasmática forma o endossoma inicial, que amadurece no endossomo tardio que então produz vesículas intraluminais (ILVs) em corpos multivesiculares (MVBs). O tamanho dos exossomos, normalmente, é equivalente ao das ILVs de onde são originários (diâmetro de 40–100 nm). Após a maturação, os MVBs podem ser direcionados para os lisossomos, onde suas cargas são degradadas, ou transportadas para a membrana plasmática com a qual se fundem para liberar as ILVs no meio extracelular, o processo referido como liberação de exossomo (Colombo et al., 2014; Jones et al., 2018).

Wollert et al., 2010 e Colombo et al., 2013 demonstraram que dois mecanismos estão envolvidos na seleção de carga, agrupamento e formação de ILVs dentro de MVBs. Um mecanismo é mediado pelo complexo endossômico de triagem necessário para o transporte (ESCRT) e o outro mecanismo é independente do ESCRT. O ESCRT consiste em quatro complexos de proteínas com várias subunidades (ESCRT 0, I, II e III) juntamente com proteínas associadas ao ESCRT (Frydrychowicz et al., 2015).

O recrutamento de ESCRT requer a presença de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI₃P) na membrana limitadora de MVB. O substrato de tirosina quinase (HRS) regulado pelo fator de crescimento de hepatócitos, então se liga à cauda citosólica ubiquitinada de proteínas endocitadas, resultando em seu recrutamento para MVBs (Schmidt et al., 2012; Théry et al., 2002)

Colombo et al., 2013 utilizaram a inibição do ESCRT como uma ferramenta para investigar a biogênese e a secreção de exossomos. Tal estudo demonstrou que o silenciamento de ESCRT-0 ou ESCRT-I pode reduzir quantitativamente a secreção de vesículas extracelulares, alterar o tamanho ou a composição dos exossomos. No entanto, a redução do ESCRT-III aumenta a secreção dos exossomos, sem alterar suas características.

Já os mecanismos independentes de ESCRT estão associados a lipídeos, proteínas transmembrana ou proteínas de choque térmico que foram identificados na formação de ILV e biogênese exossômica (Laulagnier et al., 2004; Vlassov et al., 2012).

Embora os mecanismos ESCRT-dependente e ESCRT-independentes tenham sido descritos durante o processo de biogênese do exossomo, ainda não é completamente esclarecido se esses mecanismos coexistem simultaneamente para

regular a formação de um único tipo de MVB ou se eles indicam a existência de populações heterogêneas de MVBs, que são regulados por vários mecanismos durante a biogênese do exossomo dentro das células.

O sinal crítico para endocitose e formação de MVB é iniciado pela ubiquitinação de proteínas da membrana plasmática e, além de ocorrer a exocitose do MVB, pode haver a degradação do mesmo, graças ao lisossomo da própria célula (Raposo e Stoorvogel, 2013), conforme observado na figura 6.

No que tange à secreção de exossomos, a família RAB de pequenas trifosfatases de guanosina (GTPases) controla o tráfico vesicular intracelular. Podem-se destacar as RAB11, RAB35, RAB27A e RAB27B, as quais desempenham papéis importantes na liberação de exossomos. Essas proteínas RAB ajudam os MVBs a se ancorarem à membrana plasmática, o que é necessário para a fusão final de duas membranas, permitindo a liberação de exossomos dos MVBs (Savina et al., 2005; Hsu et al., 2010; Ostrowski et al., 2010).

Os MVBs transitam para a superfície celular, se fundem com a membrana plasmática e liberam as vesículas intraluminais para o meio extracelular (Meckes e Raab-Traub, 2011; Gyorgy et al., 2011). Os exossomos são as únicas vesículas celulares secretadas que são formadas a partir de membranas internas (Meckes e Raab-Traub, 2011). Porém, um evento central para a liberação dos exossomos envolve o aumento das concentrações de Ca^{+2} intracelular (Hugel et al., 2005).

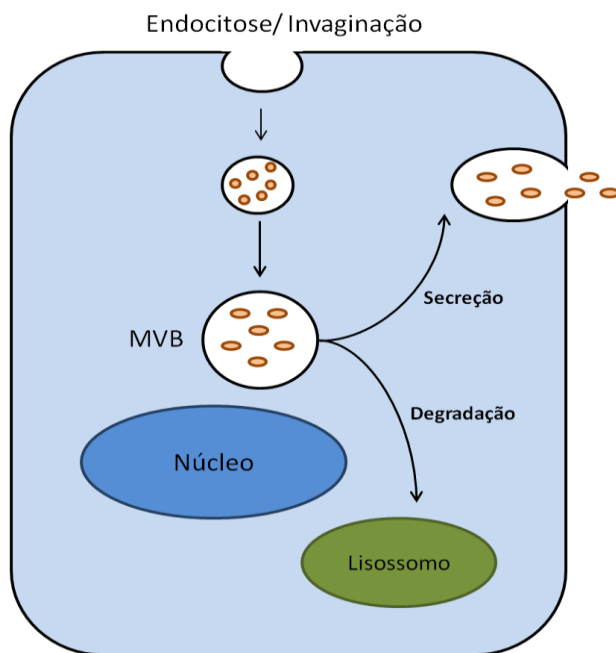


Figura 6: Esquema simplificado e representativo do processo de biogênese e secreção de exossomos. Parte da membrana plasmática invagina para o citoplasma, onde ocorre a formação do MVB, que pode sofrer degradação no lisossomo ou ser secretado para o meio extracelular. Acervo pessoal.

2.3.4 Composição

Por conseguinte de sua biogênese, os exossomos de diferentes tipos celulares possuem algumas proteínas que estão envolvidas com seu processo de formação, por exemplo, Rab GTPase (Van Niel et al., 2006). Sua membrana é composta por lipídios como colesterol, esfingomiéline, ceramida, fosfatidilserina (PS), entre outros (Théry et al., 2002). Importante destacar o papel da PS, pois a mesma está envolvida na transdução de sinais e na fusão da membrana plasmática, por ancoragem das proteínas externas por meio de suas atividades de floparse e flipase (Zomer et al., 2010).

A porção superficial do exossomo é circundada por diversas proteínas específicas de células, como tetraspaninas, integrinas, várias moléculas de adesão intercelular ou o principal complexo de histocompatibilidade (MHC), receptores de glutamato para neurônios, que também pode ser encontrado na superfície do exossomo (Zhang et al., 2014).

No tocante às tetraspaninas, estas são proteínas de membrana que contêm grandes complexos encontrados na membrana plasmática de exossomos (Meckes e Raab-Traub, 2011). Elas são caracteristicamente encontradas em alguns exossomos e

podem ser usadas para confirmar a presença de exossomos. As tetraspaninas facilitam a fusão celular, migração, sinalização e adesão célula-célula (Charrin et al., 2014; Raposo e Stoorvogel, 2013). O MHC desempenha um papel fundamental na regulação imunológica ao apresentar peptídeos antigênicos aos linfócitos T (Wieczorek et al., 2017). As proteínas de transdução de sinal (proteínas G e proteínas quinases) e enzimas proteolíticas (que podem aumentar a migração celular) também são encontradas em exossomos (Beach et al., 2014).

Os exossomos podem também carrear ácidos nucleicos, tais como, RNA mensageiro (RNAm) e microRNA (miRNA) (Figura 7) (Melo et al., 2014). Segundo Le et al., 2014 e Bertoli et al., 2015, os níveis de expressão de miRNA podem ter um valor prognóstico em pacientes com câncer. Como a pesquisa epigenética tem crescido nos últimos anos, os miRNAs concentram o maior interesse. Além dos miRNAs, RNAm localizados em exossomos são introduzidos dentro da célula alvo através de processos de fusão de membrana e endocitose, e subsequentemente traduzidos, resultando em proteínas que controlam as funções celulares e expressão gênica (Martins et al., 2013).

De acordo com as características de cada exossomo e sua célula geradora, eles podem atuar na célula-alvo por mecanismos diferentes: regulando a transdução do sinal intracelular através das proteínas da superfície do exossomo ou via miRNA ou RNAm (Zhang e Grizzle, 2014). Os exossomos enriquecidos de RNAm podem ser traduzidos e causar alterações nas funções biológicas nas células receptoras, enquanto o miRNA pode regular a expressão gênica.

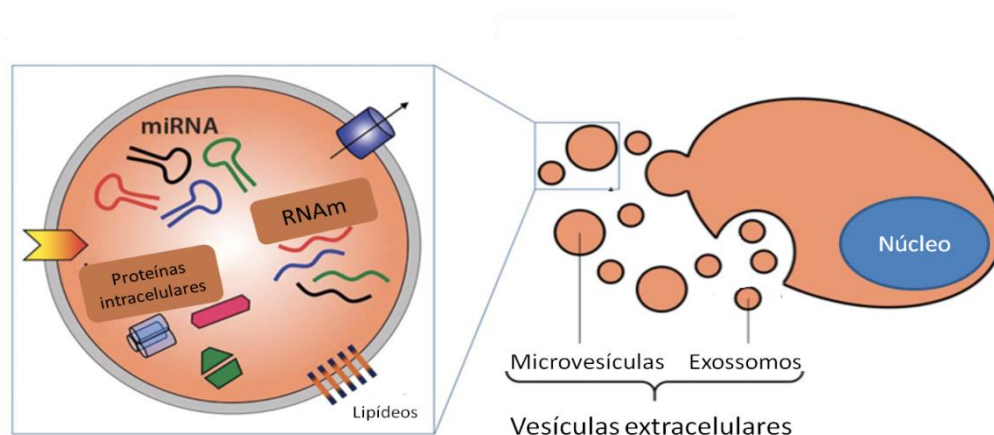


Figura 7: Composição de exossomos. Exossomos contêm em seu conteúdo interno alguns RNAm, miRNA, proteínas intracelulares e lipídeos. Adaptado de Smith et al., 2013.

2.3.5 Interação Exossomo - Célula

As funções dos exossomos nos processos fisiológicos e patológicos dependem da capacidade dos mesmos de interagirem com as células receptoras para fornecer seus conteúdos de proteínas, lipídios e RNAs. O conteúdo transportado pelos exossomos depende de vários fatores, como aspectos celulares e ambientais (Yang e Robbins, 2011; Feng et al., 2014).

O fundamento molecular para o direcionamento de exossomos ainda é indeterminado, no entanto, notado. Alguns aspectos dependentes ou não de células-alvo já foram descritos em estudos publicados. A especificidade de células alvo para a ligação de exossomos provavelmente será determinada por moléculas de adesão, como integrinas, que estão presentes nos exossomos (Denzer et al., 2000; Lindenberg e Stoorvogel, 2018).

Após a secreção, os exossomos migrarão para as células receptoras. Em estudos recentes, revelou-se que a absorção e internalização de exossomos pelas células receptoras dependem de, pelo menos, três mecanismos diferentes: (1) interação receptor-ligante de superfície; (2) internalização por fusão direta e (3) internalização por endocitose (Feng et al., 2010; Tian et al., 2010; Escrevente et al. 2011; Gross et al., 2012). Finalmente, o conteúdo transferido pelos exossomos pode influenciar a função da célula receptora (Figura 8). A endocitose mediada por receptores envolve a ligação direta de exossomos a receptores na membrana plasmática ou à membrana de um órgão endocítico (Beit-Yannai et al., 2018).

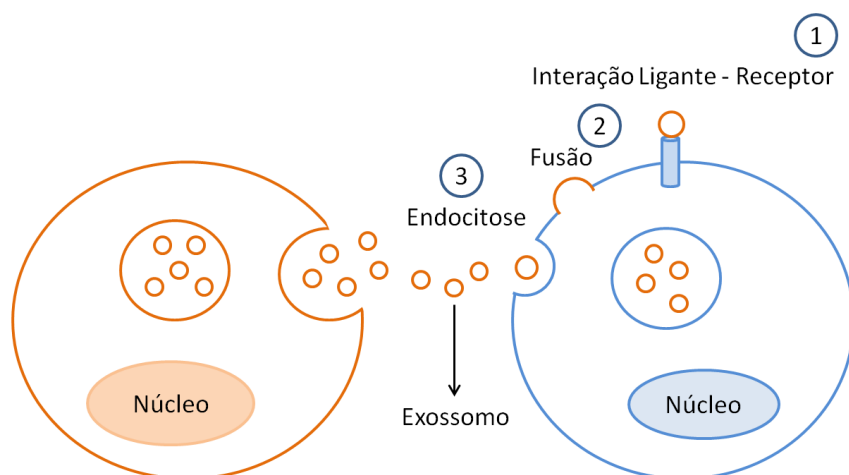


Figura 8: Esquema simplificado e representativo do processo de interação “exossomo – célula”. A interação pode ocorrer por três mecanismos distintos: (1) Interação mediante ligação do ligante-receptor, (2) Fusão das membranas plasmáticas de exossomo-célula receptora ou (3) Endocitose do exossomo. Adaptado de Biotec, 2018.

Após a ligação às células receptoras, os exossomos podem permanecer estavelmente associados à membrana plasmática ou dissociar-se, fundir-se diretamente com a membrana plasmática ou ser internalizados por vias endocíticas distintas (Melo et al., 2018). Quando endocitados, os exossomos podem se fundir posteriormente com a membrana delimitadora endossômica ou serem direcionados para lisossomos para degradação (Raposo e Stoorvogel, 2013).

No que tange a ação de RNAm e miRNA advindos de exossomos para a célula receptora, uma vez que a endocitose tenha ocorrido e os RNAm de origem da vesícula extracelular tenham sido liberados no citoplasma da célula receptora, sua tradução pode ocorrer. As proteínas traduzidas podem então afetar diretamente o fenótipo da célula (Bang e Thum, 2012; Abak et al., 2018). Em segundo lugar, através da regulação mediada por miRNA da célula hospedeira no nível pós-transcricional (Hannafon e Ding, 2013). Em terceiro lugar, através da ação da proteína extravesicular direta dentro das células receptoras (Kosaka et al., 2016). A transferência dessas cargas biologicamente ativas pode gerar mudanças funcionais nas células receptoras (Valadi et al., 2007).

2.3.6 Isolamento e Detecção

Na última década, inovações de pesquisa foram feitas para isolar exossomos de tecidos biológicos ou fluidos. Atualmente, os exossomos podem ser detectados através de diferentes métodos em quase todos os fluidos corporais humanos, inclusive no sangue, saliva e urina (Vlassov et al., 2012). Várias técnicas são empregadas para isolamento de exossomos como ultracentrifugação diferencial, técnicas de isolamento baseadas em tamanho (ultrafiltração), centrifugação de taxa zonal, técnicas baseadas em captura de imunoafinidade, precipitação exossômica e técnicas de isolamento baseadas em microfluídica (KO et al., 2016; Oliveira-Rodríguez et al., 2016). No entanto, a maioria dos estudos, utiliza uma técnica de ultracentrifugação diferencial como “padrão-ouro” de isolamento de exossomos (Li et al., 2017).

Os exossomos isolados são caracterizados por microscopia eletrônica e análise de *Western-Blot* e citometria de fluxo (FACS), com base na expressão dos marcadores de exossomos. A PCR em tempo real, a sequenciação de ácidos nucleicos, ELISA e *Microarray* também são utilizadas para a análise do conteúdo de ácidos nucleicos e proteínas em exossomos. A abordagem de perfil proteômico é utilizada para caracterizar a composição protéica dos exossomos presentes, e a contagem espectral livre de

marcadores, para avaliar a eficácia de cada método no isolamento exossomo (Rupert et al., 2017).

Devido ao crescente interesse em exossomos e outras vesículas extracelulares (EVs) e seu potencial uso em terapias ou como biomarcadores para doenças, *kits* comercialmente disponíveis, que permitem “procedimentos fáceis de isolamento” estão sendo desenvolvidos e comercializados (Ding et al, 2018).

2.4 Justificativa

O papel de miRNAs como moduladores do seu microambiente, seja este fisiológico ou patológico, vêm sendo discutido e existem relatos que estes podem advir de exossomos, podendo ter um caráter tanto supressor, quanto estimulador do SNC. Neste contexto, tendo em vista também a ascensão do interesse por exossomos e seus papéis, estudos que busquem integrar e avaliar o impacto de miRNA na biologia da depressão (doença que têm afetado recorrentemente a sociedade) podem ajudar a acrescentar informações sobre como os exossomos e os microRNAs exossomais comportam neste contexto de depressão, sobretudo quando não se tem, ainda, um diagnóstico para depressão por um método bioquímico (Youngstrom et al., 2018).

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo Geral

Analisar o papel de miRNAs derivados de exossomos na depressão.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar biomarcadores de miRNA relacionados a alterações correlacionadas a depressão.

3.2 METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão sistemática da literatura. Um estudo secundário, ou seja, dados advindos de outros estudos ditos primários (os quais produziram e geraram os dados), a fim de reunir trabalhos e estudos semelhantes, realizar uma análise sobre os mesmos em seus métodos e, quando possível, uma análise estatística, chamada metanálise. A revisão sistemática é um instrumento de construção de uma análise ampla da literatura, que agrega informações para discussões a cerca da metodologia aplicada e resultados obtidos, assim como reflexões sobre a realização de futuros estudos (Rother, 2007; Otani e Barros, 2011).

O método a ser abordado pela revisão sistemática é composto por sete etapas (Rother, 2007):

1. Formulação da pergunta norteadora
2. Localização dos estudos a serem usados como base
3. Avaliação crítica dos estudos
4. Coleta de dados
5. Análise e apresentação de dados
6. Interpretação dos dados
7. Aprimoramento e atualização da revisão.

A pesquisa dos estudos foi realizada a partir do levantamento de dados de miRNAs, exossomos e depressão em estudos publicados nas bases de dados: *PubMed*, Biblioteca Virtual de Saúde (BVS) e *Medline*.

As palavras-chave utilizadas nas pesquisas foram: ‘microRNA’, ‘exosome’ e ‘depression’. Todas as combinações foram feitas utilizando-se o operador booleano ‘AND’.

Foram incluídos estudos considerados elegíveis, os quais atendiam aos seguintes critérios de inclusão: estudos de expressão de miRNAs derivados de exossomos, pacientes vivos ou mortos diagnosticados com depressão, estudos de modelos experimentais, *in vivo* ou *in vitro*, com amostras controle e com dados brutos disponíveis no estudos publicados.

Para tal, foram considerados os seguintes critérios de exclusão: a) não ter disponível a versão inteira do estudo; b) estudos com uso de microvesículas; c) estudos que não contemplem depressão; d) estudos que não contemplem miRNA derivados de exossomos.

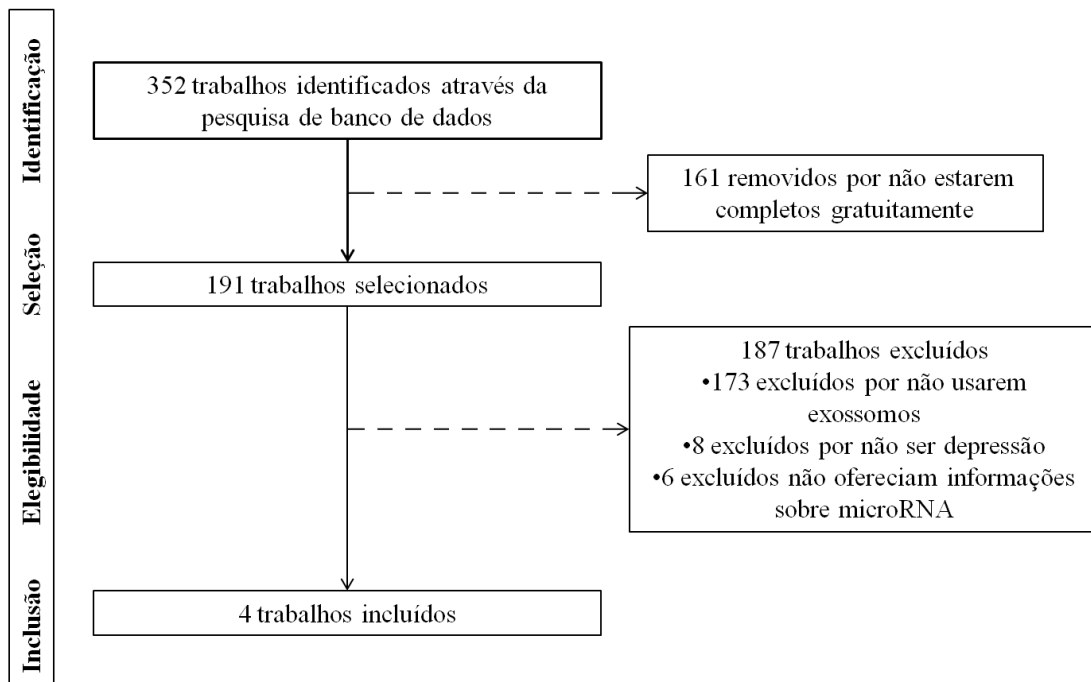


Figura 9: Fluxograma do processo de revisão sistemática utilizado. Foram realizadas buscas nas bases de dados e os estudos foram sendo filtrados de acordo com os critérios de exclusão supracitados. Ao final do processo, 4 trabalhos foram incluídos na revisão. Acervo pessoal.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 MicroRNAs com expressão alterada na Depressão

Após terem sido seguidas as metodologias supracitadas, restaram quatro artigos que foram incluídos para a análise final, conforme mostrado na figura 9. De acordo com os estudos levantados (Dwivedi, 2014; Brites e Fernandes, 2015; Mondal et al., 2017; Tavakolizadeh et al., 2018), 45 microRNAs e precursores de microRNAs foram identificados com expressão significativa (seja aumentada ou diminuída) relacionados à depressão. Estes 45 microRNAs desempenham papéis na regulação de genes associados a processos de apoptose, neurogênese, receptor de catecolaminas, diferenciação celular, controle de expressão gênica e desenvolvimento vascular. Na tabela 1 tem-se os 45 microRNAs com expressão aumentada ou diminuída, sua amostra a qual foi detectada, nível de regulação e método de análise. Destes 45 microRNA, 22 estavam em *downregulation* e 23 em *upregulation*.

Dos microRNAs identificados, as amostras (tecido ou fluido) as quais foram possíveis realizar a identificação são de: tecido *post-mortem* (PM), sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR). Pode-se destacar o fato que não fora utilizado ou não tenha

sido capaz de se discernir exossomos e microRNAs exossomais derivados de urina, fato bem descrito na literatura (Pisitkun et al., 2004; Huebner et al., 2015).

Como método de análise, foram usados apenas o *Microarray* (Microarranjo de DNA) e o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Uma vez que se analisa microRNA, se faz necessário técnicas que tenham capacidade para conseguir realizar a inspeção neste nível molecular. A tecnologia *Microarray* (n=13) é uma poderosa ferramenta de alto rendimento capaz de monitorar a expressão de milhares de pequenos RNAs não codificantes (miRNA) de uma só vez, dentro de dezenas de amostras processadas em paralelo em um único experimento (Schwarzenbach et al., 2015). Já o qRT-PCR (n=44), é possível medir o nível de expressão de miRNA ou quantificação específica de miRNAs maduros em métodos que estudam a regulação de funções biológicas e que usam perfis de miRNA como marcadores diagnósticos para diversas doenças, como depressão (Figura 10) (Moldovan et al., 2014).

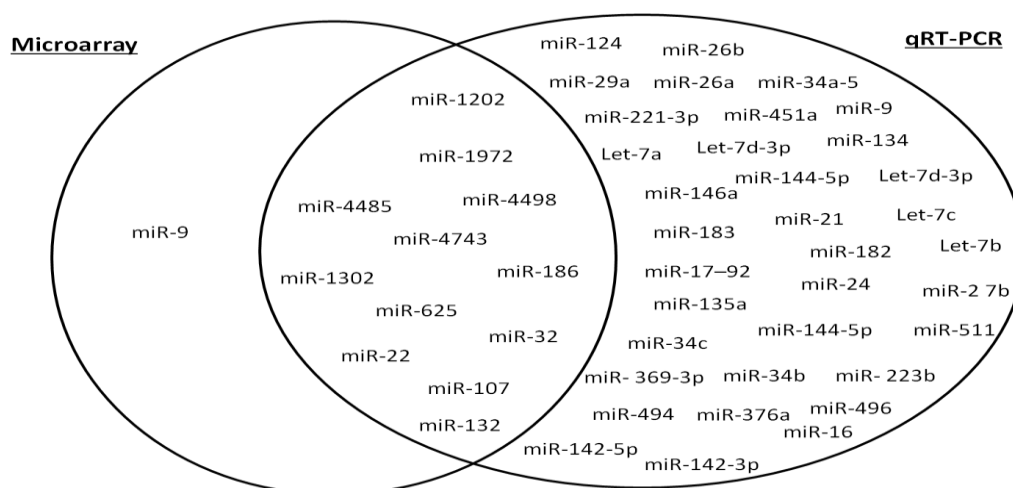


Figura 10: Diferença representativa dos métodos de análise usados. Foram obtidos 44 microRNAs pela técnica de qRT-PCR, sendo destes, 13 também detectados por *Microarray*. O microRNA detectado apenas por *Microarray* foi o miR-9. Acervo pessoal.

Estas moléculas exercem seus efeitos através do direcionamento de uma variedade de vias celulares e moleculares envolvidas em diferentes processos fisiológicos. Esses microRNAs derivados de exossomos sugerem à comunidade científica que os encontrados em sangue ou LCR poderiam ser usados como biomarcadores diagnósticos e terapêuticos para pacientes com depressão, já que, para indivíduos vivos, a busca em tecidos *post-mortem* não condiz com a sua realidade (O'connor et al., 2012; Allen et al., 2014) (Tabela 2).

Tabela 2: Regulação de microRNA envolvidos na depressão. Alguns microRNAs e precursores estão envolvidos na biologia da depressão e podem ser detectados via qRT-PCR ou *Microarray* de diferentes tipos de amostras: tecido *post-mortem* (PM), sangue ou líquido cefalorraquidiano (LCR). (1) = Dwivedi, 2014; (2) = Brites e Fernandes, 2015; (3) = Mondal et al., 2017 e (4) = Tavakolizadeh et al., 2018.

microRNA	Regulação	Método de análise	Amostra
miR-1202	↓	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	PM (2;4)
Let-7a	↑	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-124	↑	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-29a	↑	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-26a	↑	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-26b	↑	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-1972	↑	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-4485	↑	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-4498	↑	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-4743	↑	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-221-3p	↑	qRT-PCR	Sangue/LCR (2;4)
miR-34a-5	↑	qRT-PCR	PM (2;4)
Let-7d-3p	↑	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-451a	↑	qRT-PCR	Sangue/LCR (2;4)
miR-132	↑	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-182	↑	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-134	↓	qRT-PCR	PM (2;4)
miR-183	↑	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-1302	↑	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue/LCR (2;4)
miR-625	↑	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue/LCR (2;4)
miR-9	↑	<i>Microarray</i>	PM (2;4)
miR-144-5p	↓	qRT-PCR	Sangue (2;4)
miR-17-92	↑	qRT-PCR	Sangue (4)
miR-146a	↓	qRT-PCR	PM (4)
miR-16	↑	qRT-PCR	Sangue/LCR (4)

Let-7b	↓	qRT-PCR	Sangue (1)
Let-7c	↓	qRT-PCR	Sangue (1)
miR-21	↑	qRT-PCR	Sangue (4)
miR-22	↓	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	PM (4)
miR-135a	↓	qRT-PCR	Sangue (4)
miR-32	↓	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue (4)
miR-186	↓	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue (4)
miR-107	↓	<i>Microarray</i> /qRT-PCR	Sangue (4)
miR-142 -5p	↓	qRT-PCR	PM (4)
miR-142-3p	↓	qRT-PCR	PM (4)
miR- 494	↓	qRT-PCR	PM (4)
miR-376a	↓	qRT-PCR	PM (4)
miR-496	↓	qRT-PCR	PM (4)
miR-369-3p	↓	qRT-PCR	Sangue (4)
miR-223b	↓	qRT-PCR	Sangue (4)
miR-27b	↓	qRT-PCR	Sangue (4)
miR-124	↓	qRT-PCR	Sangue (4)
miR-34b	↓	qRT-PCR	Sangue/LCR (4)
miR- 34c	↓	qRT-PCR	PM (4)
miR-511	↑	qRT-PCR	Sangue (4)

3.3.2 MicroRNAs e sua importância funcional na Depressão

No que tange à função desempenhada por esses microRNAs, a tabela 3 faz essa correlação de microRNA e sua função desempenhada no SNC. Entender a função desempenhada por determinado microRNA, estando o mesmo com uma maior ou menor expressão, dentro do contexto de SNC é fundamental para entender seu papel na biologia da depressão (Du e Zamore, 2007).

Uma das principais cargas que podem ser transferidas por exossomos são os microRNAs. Estas moléculas são capazes de alterar o comportamento das células receptoras, afetando várias vias celulares e moleculares (Melo et al., 2014). Assim, a

identificação de miRNAs exossômicos poderia ser introduzida em novos biomarcadores diagnósticos e terapêuticos nessa área. Os exossomos ao carregarem suas cargas (miRNAs, mRNAs e proteínas) às células receptoras podem exercer seus efeitos e poderiam induzir ou inibir vários mecanismos, como plasticidade neural, que poderiam contribuir para a iniciação e progressão de várias doenças mentais, como a depressão (Tsilioni et al., 2014).

Os microRNAs derivados de exossomos demonstram estar envolvidos na manifestação da depressão e nas ações terapêuticas dos antidepressivos (Smalheiser et al., 2012). No caso do miR-183, essa vulnerabilidade aumentada pode ser secundária a ciclos circadianos interrompidos (Dambal et al., 2015), o que gera um aumento da produção e liberação de cortisol; ademais, a alteração do ciclo circadiano leva a um estresse crônico. Este, por sua vez, aumenta a liberação de CRH, que, novamente, liberará mais cortisol (Rang et al., 2012).

O miR-16 regula negativamente a expressão do transportador de serotonina (SERT) (Baudry et al., 2010), o principal alvo para a classe de fármacos antidepressivos inibidores da recaptação da serotonina (ISRS). Ao negativamente regular a expressão do SERT, pode alterar a resposta ao tratamento antidepressivo.

Além de ter como alvo os receptores de serotonina, o miR-22 também tem como alvo receptores de BDNF (Dwivedi, 2014). Acredita-se que aumentos no BDNF medeiam indiretamente os efeitos antidepressivos dos ISRS, portanto a superexpressão do BDNF direcionado a miRNA após o tratamento medicamentoso sugere potencialmente *feedback* homeostático para manter o BDNF dentro de um intervalo favorável (Castrén e Rantamäki, 2010). Drogas que induzem a expressão do BDNF, sem aumentos concordantes no miRNA inibitório, podem se mostrar mais específicas e eficientes para o tratamento antidepressivo do que os antidepressivos atuais.

Embora esteja claro que os microRNAs funcionam como um mecanismo para a regulação pós-transcricional (MacFarlane e Paul, 2010), não foi conclusivamente provado se, sob condições de homeostase ou patologia, sua presença nos fluidos corporais é simplesmente um subproduto da degradação celular ou se eles estão ativamente secretados nos fluidos corporais para mediar a regulação dos genes intercelulares. No entanto, a correlação entre microRNAs circulantes e microRNAs de tecido periférico sugere que em fluidos humanos eles podem servir como biomarcadores. No entanto, no contexto da depressão, poucos estudos têm apoiado tais

correlações entre as leituras de circulação e central da expressão de microRNAs (Fan et al, 2014).

Apesar do fato de o tamanho da amostra do presente estudo não tenha sido muito grande e não fossem incluídos outros distúrbios neurodegenerativos, como esquizofrenia e transtorno de ansiedade, que podem causar restrição no desenvolvimento de biomarcadores de depressão maior (Rao et al., 2013), os resultados atuais poderiam fornecer a breve e inicial justificativa para investigações futuras para fins diagnósticos e prognósticos em pacientes com depressão. Portanto, um tamanho de amostra maior e um estudo abrangente em humanos devem ser conduzidos para demonstrar ainda mais a capacidade diagnóstica dos presentes miRNAs para depressão em estudos futuros.

Tabela 3: Relação microRNA e sua respectiva função. Alguns microRNA e precursores possuem funções regulatórias importantes para a biologia da depressão, como a regulação da neurogênese, receptores fundamentais alvos de antidepressivos, transmissão sináptica, regulação de genes e outras demais funções. (1) = Dwivedi, 2014; (2) = Brites e Fernandes, 2015; (3) = Mondal et al., 2017 e (4) = Tavakolizadeh et al., 2018.

microRNA	Função
miR-1202	Modulador de neurotransmissão glutamatérgica, dopaminérgica, gabaérgica e serotoninérgica. Regulador de comportamentos relacionados à ansiedade (2;4)
Let-7a	Diferenciação neuronal. Formação e plasticidade das sinapses (2;4)
miR-124	Regulação neurogênese (2;4)
miR-29a	Estresse (2;4)
miR-26a	Desenvolvimento neuronal (2;4)
miR-26b	Regulação ciclo celular e apoptose (2;4)
miR-1972	Desenvolvimento e função do cérebro (2;4)
miR-4485	Orientação e extensão do axônio, transmissão sináptica, aprendizagem e memória (2;4)
miR-4498	Transmissão sináptica Aprendizagem e memória (2;4)
miR-4743	Transmissão sináptica Aprendizagem e memória (2;4)
miR-221-3p	Receptores de 5-HT, receptor CRH Transportadores de glutamato (2;4)
miR-34a-5	Receptores de 5-HT, receptor CRH Transportadores de glutamato (2;4)
Let-7d-3p	Receptores de 5-HT, receptor CRH Transportadores de glutamato (2;4)
miR-451a	Regulação BDNF (2;4)
miR-132	Regulação BDNF (2;4)
miR-182	Regulação BDNF (2;4)
miR-134	Regulação tamanho espinhas dendríticas (2;4)
miR-183	Regulação ciclo circadiano (2;4)
miR-1302	Regulação P2RX7 Regulação transmissão sináptica/ Regulação receptores scavenger (2;4)
miR-625	Regulação P2RX7 Regulação transmissão sináptica/ Regulação receptores scavenger (2;4)

miR-9	Crescimento dendrítico Transmissão sináptica (2;4).
miR-144-5p	Regulação vias PKC Humor e estresse (2;4)
miR-17-92	Regulação neurogênese Ansiedade e estresse (4)
miR-146a	Estresse Neurodegeneração (4)
miR-16	Regulação BDNF, vias 5-HT Regulação expressão SERT (1;4)
Let-7b	Regulação VEGF (1)
Let-7c	Regulação VEGF (1)
miR-21	Regulação ERK Regulação proteína gp130 (4)
miR-22	Regulação BDNF, receptor 5-HT, MAO-A Regulação sinalização proteína G (4)
miR-135a	Controle de proteostase, manutenção da integridade genômica, regulação da atividade transcricional e controle imunoinflamatório (4)
miR-32	Regulação sinalização tirosina-quinase (4)
miR-186	Regulação BACE1 (4)
miR-107	Regulação BDNF (4)
miR-142 -5p	Regulação MAO-A (4)
miR-142-3p	Regulação MAO-A (4)
miR- 494	Estresse Regulação transcrição gênica (4)
miR-376a	Regulação SC35 (4)
miR-496	Regulação transcrição gênica (4)
miR-369-3p	Regulação expressão de RNAm (4)
miR-223b	Regulação SLC17A1 (4)
miR-27b	Regulação MIP-1 β (4)
miR-124	Regulação vias PKC, MAPK (1;2;4)
miR-34b	Regulação vias PKC, MAPK (1;4)
miR- 34c	Regulação PABPC1 (1;4)
miR-511	Estresse (4)

Por fim, observamos inúmeros microRNAs com possibilidades de se tornarem marcadores depressivos. Alguns definindo pior, ou melhor, prognóstico da doença; outros possíveis marcadores periféricos de diagnóstico ou controle da doença; e outros servindo como terapia alvo. O uso de microRNA derivados de exossomos pode ser dar como uma forma de diagnóstico ou prognóstico e para realizar o acompanhamento da progressão ou não da depressão (Figura 11).

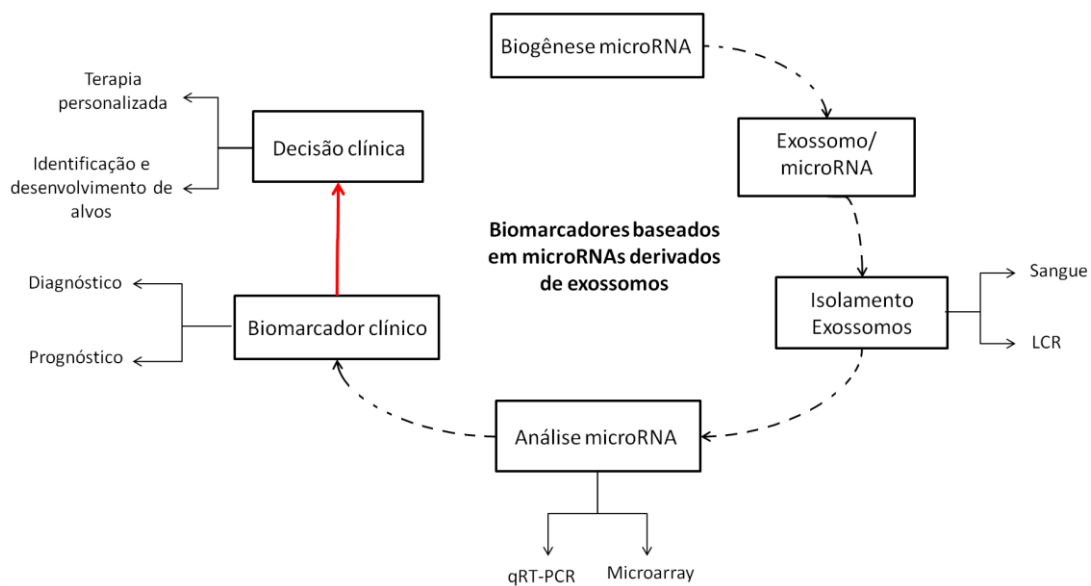


Figura 11: Esquema simplificado e representativo de biomarcador baseado em microRNA derivados de exossomos em indivíduos vivos. A estratégia tem início na biogênese do microRNA, que é carregado por exossomos. O isolamento de exossomos é feita a partir de fluidos humanos, passados por um método de análise (qRT-PCR ou *Microarray*) e, ao se identificar o biomarcador, é realizada a decisão clínica. Acervo pessoal.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Pode-se concluir, portanto que miRNAs desempenham papéis críticos na patogênese da depressão. Além disso, miRNAs têm papéis importantes em resposta aos agentes terapêuticos utilizados em pacientes com depressão. Portanto, parece que os miRNAs poderiam ser empregados como biomarcadores diagnósticos para monitorar pacientes com depressão. A capacidade de prever a resposta ao tratamento com base na expressão de biomarcadores confere vantagem clínica em termos de escolha da estratégia terapêutica correta para o paciente certo.

Apesar desses desafios, microRNAs derivados de exossomos devem continuar sendo um foco significativo no desenvolvimento de novos tratamentos antidepressivos. De grande interesse seria o uso adicional de abordagens de alto rendimento para examinar a desregulação global do miRNA em modelos animais. Continuar a priorizar esses estudos ajudaria a identificar potenciais biomarcadores de miRNA de depressão clínica e permitir a triagem da suscetibilidade do paciente. Da mesma forma, o perfil de alterações no miRNA no soro em pacientes com diferentes graus de resposta aos antidepressivos atuais poderia ajudar a prever a eficácia das opções de tratamento para os indivíduos. Essas medidas permitiriam tratamentos mais informados e direcionados ao paciente e reduziriam os efeitos negativos fora do alvo. Tais medidas também encontraram sucesso em uma série de transtornos e, portanto, sustentam predizer com mais precisão a vulnerabilidade e resiliência do paciente na depressão clínica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAK, Atefe; ABHARI, Alireza; RAHIMZADEH, Sevd. Exosomes in cancer: small vesicular transporters for cancer progression and metastasis, biomarkers in cancer therapeutics. **PeerJ**, v. 6, p. e4763, 2018.

AL-RUTHIA, Yazed Sulaiman; HONG, Song Hee; SOLOMON, David. Do depressed patients on adjunctive atypical antipsychotics demonstrate a better quality of life compared to those on antidepressants only? A comparative cross-sectional study of a nationally representative sample of the US population. **Research in Social and Administrative Pharmacy**, v. 11, n. 2, p. 228-240, 2015.

ALLEN, Andrew P. et al. Biological and psychological markers of stress in humans: focus on the Trier Social Stress Test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 38, p. 94-124, 2014.

American Psychiatric Association. (2013). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)**. Washington, DC: Author.

ARROLL, Bruce et al. Antidepressants for treatment of depression in primary care: a systematic review and meta-analysis. **Journal of primary health care**, v. 8, n. 4, p. 325-334, 2016.

ATKIN-SMITH, Georgia K. et al. A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. **Nature communications**, v. 6, p. 7439, 2015.

BANG, Cláudia; THUM, Thomas. Exosomes: new players in cell-cell communication. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 11, p. 2060-2064, 2012.

BARBOSA, Fabiana de Oliveira; MACEDO, Paula Costa Mosca; SILVEIRA, Rosa Maria Carvalho da. Depressão e o suicídio. **Revista da SBPH**, v. 14, n. 1, p. 233-243, 2011.

BAUDRY, Anne et al. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. **Science**, v. 329, n. 5998, p. 1537-1541, 2010.

BAVAMIAN, Sabine et al. Dysregulation of miR-34a links neuronal development to genetic risk factors for bipolar disorder. **Molecular psychiatry**, v. 20, n. 5, p. 573, 2015.

BEACH, Allison et al. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. **Journal of ovarian research**, v. 7, n. 1, p. 14, 2014.

BEIT-YANNAL, Elie; TABAK, Saray; STAMER, W. Daniel. Physical exosome: exosome interactions. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, n. 3, p. 2001-2006, 2018.

BERTOLI, Gloria; CAVA, Claudia; CASTIGLIONI, Isabella. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. **Theranostics**, v. 5, n. 10, p. 1122, 2015.

BHAGWAGAR, Zubin et al. Normalization of enhanced fear recognition by acute SSRI treatment in subjects with a previous history of depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 1, p. 166-168, 2004.

BIOTEC, Miltenyi Macs. Exosome analysis using a multiplex bead-based flow cytometry assay. **Miltenyibiotec**, 2018. Disponível em <<https://www.miltenyibiotec.com/AT-en/products/macsmolecular/reagents/organelle-research/exosome-isolation/exosome-isolation-kit-cd63-human.html>>. Acesso em 26 de out. de 2018.

BLENDY, Julie A. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1144-1150, 2006.

BRITES, Dora; FERNANDES, Adelaide. Neuroinflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 476, 2015.

BUNNEY, William E.; DAVIS, John M. Norepinephrine in depressive reactions: A review. **Archives of General Psychiatry**, v. 13, n. 6, p. 483-494, 1965.

BURKE, Heather M. et al. Depression and cortisol responses to psychological stress: a meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 9, p. 846-856, 2005.

CAMUSSI, Giovanni et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. **Kidney international**, v. 78, n. 9, p. 838-848, 2010.

CARUSO, Sarah; POON, Ivan KH. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: More than just debris. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1486, 2018.

CASCADE, Elisa; KALALI, Amir H.; KENNEDY, Sidney H. Real-world data on SSRI antidepressant side effects. **Psychiatry (Edgmont)**, v. 6, n. 2, p. 16, 2009.

CASTRÉN, Eero; RANTAMÄKI, Tomi. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: reactivation of developmental plasticity. **Developmental neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 289-297, 2010.

CHARGAFF, Erwin; WEST, Randolph. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. **J Biol Chem**, v. 166, n. 1, p. 189-197, 1946.

CHARRIN, Stéphanie et al. Tetraspanins at a glance. **J Cell Sci**, v. 127, n. 17, p. 3641-3648, 2014.

CHEETHAM, Sharon C. et al. Brain 5-HT₁ binding sites in depressed suicides. **Psychopharmacology**, v. 102, n. 4, p. 544-548, 1990.

COLOMBO, Marina et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. **J Cell Sci**, p. jcs. 128868, 2013.

COLOMBO, Marina; RAPOSO, Graça; THÉRY, Clotilde. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 255-289, 2014.

CRAWFORD, N. The presence of contractile proteins in platelet microparticles isolated from human and animal platelet-free plasma. **British journal of haematology**, v. 21, n. 1, p. 53-69, 1971.

CRYSTAL, Stephen et al. Diagnosis and treatment of depression in the elderly medicare population: predictors, disparities, and trends. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 51, n. 12, p. 1718-1728, 2003.

D'SOUZA-SCHOREY, Crislyn; SCHOREY, Jeffrey S. Regulation and mechanisms of extracellular vesicle biogenesis and secretion. **Essays in biochemistry**, v. 62, n. 2, p. 125-133, 2018.

DAMBAL, Shweta et al. The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 15, p. 7173-7188, 2015.

DE CHOUDHURY, Munmun; COUNTS, Scott; HORVITZ, Eric. Social media as a measurement tool of depression in populations. In: **Proceedings of the 5th Annual ACM Web Science Conference**. ACM, 2013. p. 47-56.

DE OLIVEIRA, Ricardo Larroyed et al. Capacitação dos profissionais da Atenção Primária à Saúde de São Bento do Sul/SC sobre o suicídio em adolescentes: ações do setembro amarelo. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 6, n. 3, p. 16-18, 2017.

DENZER, Kristin et al. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 3, p. 1259-1265, 2000.

DING, Meng et al. Comparison of commercial exosome isolation kits for circulating exosomal microRNA profiling. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 16, p. 3805-3814, 2018.

DU, Tingting; ZAMORE, Phillip D. Beginning to understand microRNA function. **Cell research**, v. 17, n. 8, p. 661, 2007.

DVORAK, Harold F. et al. Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. **Cancer Research**, v. 43, n. 9, p. 4434-4442, 1983.

DWIVEDI, Yogesh. Emerging role of microRNAs in major depressive disorder: diagnosis and therapeutic implications. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 43, 2014.

ELDER, Betty L.; MOSACK, Victoria. Genetics of depression: an overview of the current science. **Issues in mental health nursing**, v. 32, n. 4, p. 192-202, 2011.

ESCREVENTE, Cristina et al. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. **BMC cancer**, v. 11, n. 1, p. 108, 2011.

FAN, Hui-min et al. Differential expression of microRNA in peripheral blood mononuclear cells as specific biomarker for major depressive disorder patients. **Journal of psychiatric research**, v. 59, p. 45-52, 2014.

FEIGHNER, John P. et al. Diagnostic criteria for use in psychiatric research. **Archives of general psychiatry**, v. 26, n. 1, p. 57-63, 1972.

FENG, Du et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. **Traffic**, v. 11, n. 5, p. 675-687, 2010.

FENG, Yuliang et al. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e88685, 2014.

FERREIRA, Cláudia Natália et al. A cell-based model of coagulation and its implications. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416-421, 2010.

FIORE, Roberto; SIEGEL, Gabriele; SCHRATT, Gerhard. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1779, n. 8, p. 471-478, 2008.

FLEISSNER, F. et al. Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine. **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 2, p. 289-297, 2012.

FRYDRYCHOWICZ, M. et al. Exosomes–Structure, Biogenesis and Biological Role in Non-Small-Cell Lung Cancer. **Scandinavian journal of immunology**, v. 81, n. 1, p. 2-10, 2015.

GILLEN, Robert et al. Depressive symptoms and history of depression predict rehabilitation efficiency in stroke patients. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 82, n. 12, p. 1645-1649, 2001.

GRAF, Claudine; RUF, Wolfram. Tissue factor as a mediator of coagulation and signaling in cancer and chronic inflammation. **Thrombosis research**, v. 164, p. S143-S147, 2018.

GROSS, Julia Christina et al. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. **Nature cell biology**, v. 14, n. 10, p. 1036, 2012.

GYÖRGY, Bence et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667-2688, 2011.

HANNAFON, Bethany; DING, Wei-Qun. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 7, p. 14240-14269, 2013.

HERNANDEZ-RAPP, Julia; RAINONE, Sara; HÉBERT, Sébastien S. MicroRNAs underlying memory deficits in neurodegenerative disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 73, p. 79-86, 2017.

HILLHOUSE, Todd M.; PORTER, Joseph H. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. **Experimental and clinical psychopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 1, 2015.

HINDMARCH, I. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. **European Psychiatry**, v. 17, p. 294-299, 2002.

HIRSCHFELD, Robert. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **The Journal of clinical psychiatry**, 2000.

HORST, W. Dale; PRESKORN, Sheldon H. Mechanisms of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. **Journal of affective disorders**, v. 51, n. 3, p. 237-254, 1998.

HOWELL, Leonard L.; CUNNINGHAM, Kathryn A. Serotonin 5-HT₂ receptor interactions with dopamine function: implications for therapeutics in cocaine use disorder. **Pharmacological reviews**, v. 67, n. 1, p. 176-197, 2015.

HSU, Chieh et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. **The Journal of cell biology**, v. 189, n. 2, p. 223-232, 2010.

HUEBNER, Alyssa R. et al. Exosomes in urine biomarker discovery. In: **Urine Proteomics in Kidney Disease Biomarker Discovery**. Springer, Dordrecht, 2015. p. 43-58.

HUGEL, Bénédicte et al. Membrane microparticles: two sides of the coin. **Physiology**, v. 20, n. 1, p. 22-27, 2005.

HUYS, Quentin JM; DAW, Nathaniel D.; DAYAN, Peter. Depression: a decision-theoretic analysis. **Annual review of neuroscience**, v. 38, p. 1-23, 2015.

IERO, M. et al. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 1, p. 80, 2008.

JONES, Leandra et al. Pathogens and Their Effect on Exosome Biogenesis and Composition. **Biomedicines**, v. 6, n. 3, p. 79, 2018.

KAMEYAMA, Kimihiko et al. Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. **Neuron**, v. 21, n. 5, p. 1163-1175, 1998.

KERR, G. W.; MCGUFFIE, A. C.; WILKIE, S. Tricyclic antidepressant overdose: a review. **Emergency Medicine Journal**, v. 18, n. 4, p. 236-241, 2001.

KO, Jina; CARPENTER, Erica; ISSADORE, David. Detection and isolation of circulating exosomes and microvesicles for cancer monitoring and diagnostics using micro-/nano-based devices. **Analyst**, v. 141, n. 2, p. 450-460, 2016.

KOCERHA, Jannet; DWIVEDI, Yogesh; BRENNAND, Kristen J. Noncoding RNAs and neurobehavioral mechanisms in psychiatric disease. **Molecular psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 677, 2015.

KOSAKA, Nobuyoshi et al. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 4, p. 1163-1172, 2016.

LAULAGNIER, Karine et al. Mast cell-and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. **Biochemical Journal**, v. 380, n. 1, p. 161-171, 2004.

LE, Minh TN et al. miR-200-containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 12, p. 5109-5128, 2014.

LI, Pin et al. Progress in exosome isolation techniques. **Theranostics**, v. 7, n. 3, p. 789, 2017.

LINDENBERGH, Marthe FS; STOORVOGEL, Willem. Antigen presentation by extracellular vesicles from professional antigen-presenting cells. **Annual review of immunology**, v. 36, p. 435-459, 2018.

MACFARLANE, Leigh-Ann; R MURPHY, Paul. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. **Current genomics**, v. 11, n. 7, p. 537-561, 2010.

MAES, Olivier C. et al. MicroRNA: implications for Alzheimer disease and other human CNS disorders. **Current genomics**, v. 10, n. 3, p. 154-168, 2009.

MANJI, Husseini K.; DREVETS, Wayne C.; CHARNEY, Dennis S. The cellular neurobiology of depression. **Nature medicine**, v. 7, n. 5, p. 541, 2001.

MARTINS, Vilma R.; DIAS, Marcos S.; HAINAUT, Pierre. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. **Current opinion in oncology**, v. 25, n. 1, p. 66-75, 2013.

MCGEARY, Sean E. et al. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. **bioRxiv**, p. 414763, 2018.

MECKES, David G.; RAAB-TRAUB, Nancy. Microvesicles and viral infection. **Journal of virology**, p. JVI. 05853-11, 2011.

MELO, Sonia A. et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. **Cancer cell**, v. 26, n. 5, p. 707-721, 2014.

MELO, Sonia A. et al. Exosomes and immune response in cancer: friends or foes?. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 730, 2018.

MEYER, Jeffrey H. et al. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression. **Archives of general psychiatry**, v. 63, n. 11, p. 1209-1216, 2006.

MEZA-SOSA, Karla F.; PEDRAZA-ALVA, Gustavo; PÉREZ-MARTÍNEZ, Leonor. microRNAs: key triggers of neuronal cell fate. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 175, 2014.

MIGUEL-HIDALGO, José Javier et al. MicroRNA-21: expression in oligodendrocytes and correlation with low myelin mRNAs in depression and alcoholism. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 79, p. 503-514, 2017.

MOLDOVAN, Leni et al. Methodological challenges in utilizing mi RNAs as circulating biomarkers. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 18, n. 3, p. 371-390, 2014.

- MOMEN-HERAVI, Fatemeh et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. **Biological chemistry**, v. 394, n. 10, p. 1253-1262, 2013.
- MONDAL, Amal Chandra et al. Role of miRNA in Major Depressive Disorder. **Avid Science**, v. 1, 2017.
- MOON, Jangsup et al. Early diagnosis of Alzheimer's disease from elevated olfactory mucosal miR-206 level. **Scientific reports**, v. 6, p. 20364, 2016.
- MONTGOMERY, Stuart A.; ÅSBERG, MARIE. A new depression scale designed to be sensitive to change. **The British journal of psychiatry**, v. 134, n. 4, p. 382-389, 1979.
- MOURADIAN, M. Maral. MicroRNAs in Parkinson's disease. **Neurobiology of disease**, v. 46, n. 2, p. 279-284, 2012.
- NESTLER, Eric J.; CARLEZON JR, William A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-1159, 2006.
- NEUMEISTER, Alexander. Tryptophan depletion, serotonin, and depression: where do we stand?. **Psychopharmacology bulletin**, v. 37, n. 4, p. 99-115, 2003.
- O'CONNOR, R. M.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Little things on which happiness depends: microRNAs as novel therapeutic targets for the treatment of anxiety and depression. **Molecular psychiatry**, v. 17, n. 4, p. 359, 2012.
- OLIVEIRA-RODRÍGUEZ, Myriam et al. Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids. **Journal of extracellular vesicles**, v. 5, n. 1, p. 31803, 2016.
- OSTROWSKI, Matias et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nature cell biology**, v. 12, n. 1, p. 19, 2010.
- OTANI, Márcia Aparecida Padovan; BARROS, Nelson Filice de. A Medicina Integrativa e a construção de um novo modelo na saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 16, p. 1801-1811, 2011.
- PETRI, Rebecca et al. miRNAs in brain development. **Experimental cell research**, v. 321, n. 1, p. 84-89, 2014.

PISITKUN, Trairak; SHEN, Rong-Fong; KNEPPER, Mark A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 36, p. 13368-13373, 2004.

PRUDENT, Michel et al. Differences between calcium-stimulated and storage-induced erythrocyte-derived microvesicles. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 53, n. 2, p. 153-158, 2015.

RAISON, V. M. C. L. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. **Frontiers in bioscience**, v. 14, p. 5291-5338, 2009.

RANG, H.P., DALLE, M., RITTER, J.M. Farmacologia, 7ª edição, Elsevier, 2012;

RAO, Pooja; BENITO, Eva; FISCHER, André. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 6, p. 39, 2013.

RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2013.

ROTHER, Edna Terezinha. Revisão sistemática X revisão narrativa. **Acta paulista de enfermagem**, v. 20, n. 2, p. v-vi, 2007.

RUPAIMOOLE, Rajesha; SLACK, Frank J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature reviews Drug discovery**, v. 16, n. 3, p. 203, 2017.

RUPERT, Déborah LM et al. Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3164-3179, 2017.

SARASTE, Antti; PULKKI, Kari. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular research**, v. 45, n. 3, p. 528-537, 2000.

SAVINA, Ariel et al. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. **Traffic**, v. 6, n. 2, p. 131-143, 2005.

SCHMIDT, Heath D.; SHELTON, Richard C.; DUMAN, Ronald S. Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 12, p. 2375, 2011.

SCHMIDT, Oliver; TEIS, David. The ESCRT machinery. **Current Biology**, v. 22, n. 4, p. R116-R120, 2012.

SCHRATT, Gerhard M. et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. **nature**, v. 439, n. 7074, p. 283, 2006.

SCHWARZENBACH, Heidi et al. Data normalization strategies for microRNA quantification. **Clinical chemistry**, v. 61, n. 11, p. 1333-1342, 2015.

SEGRAVES, Robert Taylor; BALON, Richard. Antidepressant-induced sexual dysfunction in men. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 121, p. 132-137, 2014.

SHEINERMAN, Kira S.; UMANSKY, Samuil R. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 150, 2013.

SMALHEISER, Neil R. et al. MicroRNA expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33201, 2012.

SMITH, James A. et al. Extracellular vesicles commercial potential as byproducts of cell manufacturing for research and therapeutic use. **Bioprocess Int**, v. 13, p. 20-28, 2015.

STRIMBU, Kyle; TAVEL, Jorge A. What are biomarkers?. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463, 2010.

TAVAKOLIZADEH, Jahanshir et al. MicroRNAs and exosomes in depression: Potential diagnostic biomarkers. **Journal of cellular biochemistry**, v. 119, n. 5, p. 3783-3797, 2018.

THÉRY, Clotilde; ZITVOGEL, Laurence; AMIGORENA, Sebastian. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 8, p. 569, 2002.

TIAN, Tian et al. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. **Journal of cellular biochemistry**, v. 111, n. 2, p. 488-496, 2010.

TRICARICO, Christopher; CLANCY, James; D'SOUZA-SCHOREY, Crislyn. Biology and biogenesis of shed microvesicles. **Small GTPases**, v. 8, n. 4, p. 220-232, 2017.

TSILIONI, Irene; PANAGIOTIDOU, Smaro; THEOHARIDES, Theoharis C. Exosomes in neurologic and psychiatric disorders. **Clinical therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 882-888, 2014.

VALADI, Hadi et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, v. 9, n. 6, p. 654, 2007.

VAN NIEL, Guillaume et al. Exosomes: a common pathway for a specialized function. **Journal of biochemistry**, v. 140, n. 1, p. 13-21, 2006.

VLASSOV, Alexander V. et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1820, n. 7, p. 940-948, 2012.

WIECZOREK, Marek et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: conformational plasticity in antigen presentation. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 292, 2017.

WILLIAMS JR, John W. et al. Treatment of dysthymia and minor depression in primary care: a randomized controlled trial in older adults. **Jama**, v. 284, n. 12, p. 1519-1526, 2000.

WILSON, Ross C.; DOUDNA, Jennifer A. Molecular mechanisms of RNA interference. **Annual review of biophysics**, v. 42, p. 217-239, 2013.

WOLF, Peter. The nature and significance of platelet products in human plasma. **British journal of haematology**, v. 13, n. 3, p. 269-288, 1967.

WOLLERT, Thomas; HURLEY, James H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. **Nature**, v. 464, n. 7290, p. 864, 2010.

WONG, Garry; NASS, Richard. miRNAs and their putative roles in the development and progression of Parkinson's disease. **Frontiers in genetics**, v. 3, p. 315, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Depression and other common mental disorders: global health estimates. 2017.

WURTMAN, Richard J.; HEFTI, F.; MELAMED, E. Precursor control of neurotransmitter synthesis. **Pharmacological Reviews**, v. 32, n. 4, p. 315-335, 1980.

YANG, Chenjie; ROBBINS, Paul D. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, 2011.

YATES, Martin et al. 5HT2 receptor changes in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 27, n. 5, p. 489-496, 1990.

YOUNGSTROM, Eric A. et al. Improving the global identification of bipolar spectrum disorders: Meta-analysis of the diagnostic accuracy of checklists. **Psychological bulletin**, v. 144, n. 3, p. 315, 2018.

ZARATE, Carlos A. et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives of general psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856-864, 2006.

ZHANG, Huang-Ge; GRIZZLE, William E. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 1, p. 28-41, 2014.

ZOMER, Aniek et al. Exosomes: fit to deliver small RNA. **Communicative & integrative biology**, v. 3, n. 5, p. 447-450, 2010.