



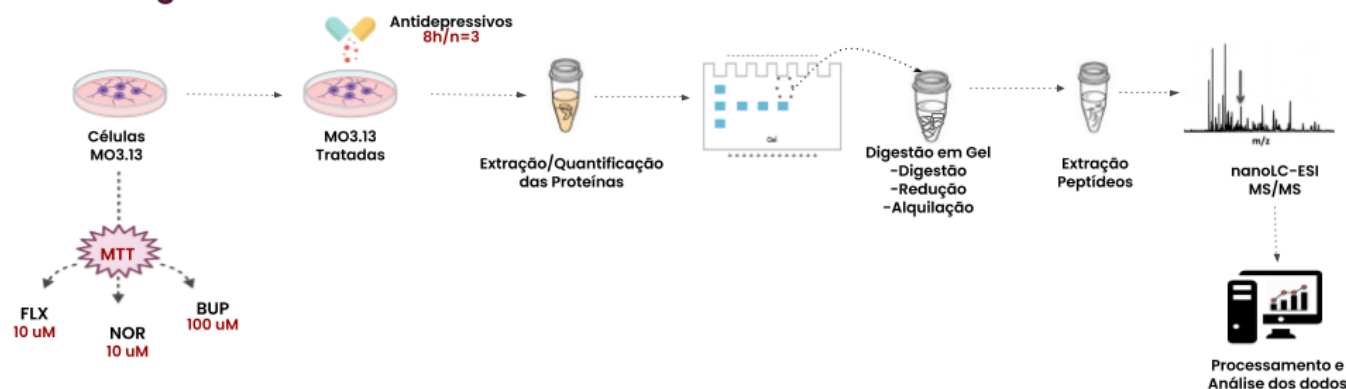
Efeitos dos Antidepressivos Fluoxetina, Nortriptilina e Bupropiona no Proteoma de Oligodendrocitos Humanos

Lívia Ramos da Silva*, Valéria Almeida, Daniel Martins-de-Souza
Laboratório de Neuroproteômica, Dept. de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, UNICAMP, SP, Brasil

Introdução

A **depressão** é um transtorno psiquiátrico crônico, debilitante e recorrente, que afeta cerca de 4,4% da população global. Os sintomas exercem influência na produtividade e qualidade de vida dos pacientes, culminando em rupturas a nível pessoal e social. A etiologia do distúrbio é complexa e heterogênea, se desenvolvendo a partir da interação de fatores biológicos e ambientais. Sua fisiopatologia não se encontra completamente elucidada, mas é bem delineada por diversas hipóteses, que em maioria, focam em rupturas neuronais. Entretanto, nos últimos anos evidências têm sugerido que os **oligodendrócitos** (OLDs) exercem um papel importante na fisiopatologia do transtorno e que possivelmente estejam envolvidos em respostas aos tratamentos com **fármacos antidepressivos** (ADs) e na severidade da depressão. O tratamento do distúrbio é pautado principalmente no uso de ADs, cujo mecanismo de ação é bem estabelecido em neurônios, mas pouco mapeado em OLDs. Deste modo, através da investigação **proteômica**, utilizando espectrometria de massas, este projeto buscou avaliar os efeitos de três classes distintas de antidepressivos em uma linhagem de oligodendrócitos humanos (MO3.13). Os ADs avaliados neste projeto foram: **fluoxetina -FLX-** (inibidor seletivo da recaptação de serotonina), **bupropiona -BUP-** (inibidor da recaptação de noradrenalina e dopamina) e **nortriptilina -NOR-** (antidepressivo tricíclico).

Metodologia



Resultados: Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

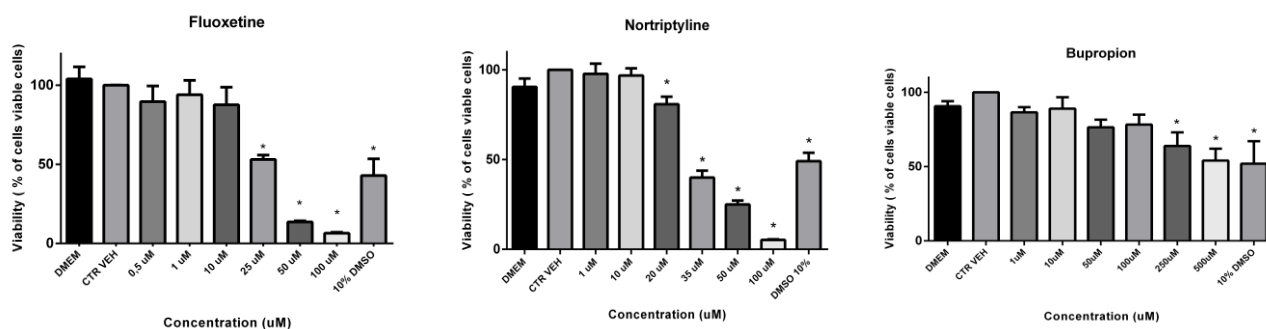


Figura 1. Efeitos das diversas concentrações de antidepressivos sobre a viabilidade dos oligodendrócitos MO3.13 após 8 horas, avaliada pelo ensaio de viabilidade celular (MTT). As diferentes concentrações foram diluídas em DMEM sem soro. Os dados são apresentados como porcentagem de variação em relação ao veículo. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Os asteriscos denotam o nível de significância; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett). Veículo = 0,5% DMSO em todos os tratamentos.

Resultados: Proteômica

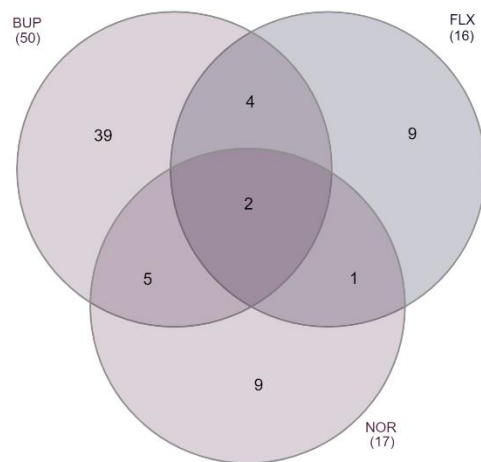


Figura 2. Proteínas diferencialmente expressas nos tratamentos com BUP, FLX e NOR representadas no Diagrama de Venn (<http://www.interactivenn.net>). Nos três tratamentos, duas proteínas se mostram comumente alteradas: *Putative annexin A2-like protein* (ANXA2P2) e *Peroxiredoxin-6* (PRDX6).

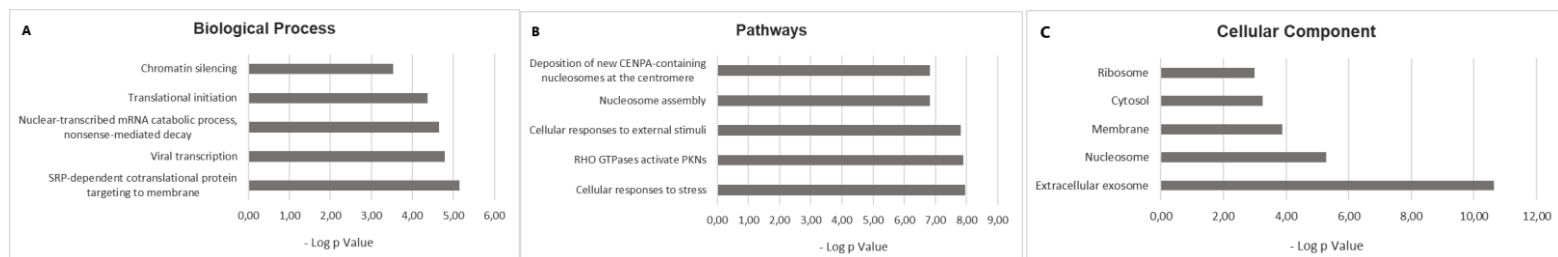
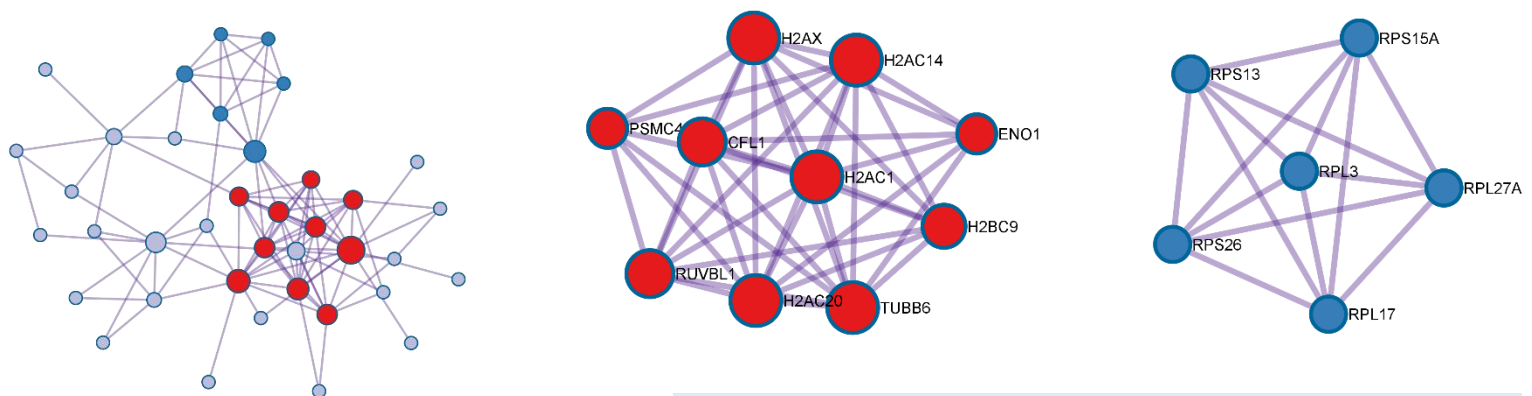


Figura 3: (A) Principais processos biológicos (David bioinformatic database; ANOVA $p < 0,05$); **(b)** principais vias bioquímicas (Reactome pathway database; ANOVA $p < 0,05$); **(c)** Principais componentes celulares (David bioinformatic database; ANOVA $p < 0,05$), relacionados com as proteínas diferencialmente reguladas identificadas no tratamento de MO3.13 com bupropiona.



Color	MCODE	GO	Description	Log10(P)
Red	MCODE_1	R-HSA-606279	Deposition of new CENPA-containing nucleosomes at the centromere	-10.3
Red	MCODE_1	R-HSA-774815	Nucleosome assembly	-10.3
Red	MCODE_1	R-HSA-5689880	Ub-specific processing proteases	-10.0
Blue	MCODE_2	CORUM:306	Ribosome, cytoplasmic	-15.0
Blue	MCODE_2	R-HSA-156902	Peptide chain elongation	-14.7
Blue	MCODE_2	R-HSA-2408557	Selenocysteine synthesis	-14.6

Figura 4: Análise de enriquecimento de interação das proteínas dos oligodendrócitos MO3.13 tratados com bupropiona (<https://metascape.org/>). A rede de interação (canto superior à esquerda) representa o subconjunto de proteínas que formam interações físicas com pelo menos um outro membro da lista. O algoritmo de Detecção do Complexo Molecular (MCODE) foi aplicado para identificar os componentes da rede densamente conectados (rede de proteínas nomeadas e coloridas canto superior direito).

Discussão e Conclusão

Os ADs FLX e NOR não alteraram significativamente o proteoma das células MO3.13. Hipotetizamos, primeiro, que a não alteração ocorreu pelo fato de que estes fármacos atuam em recaptadores de monoamina e não há na literatura evidências de que as células MO3.13 expressam, ou não, tais recaptadores. Segundo, o tempo de tratamento (8h) não foi suficiente para a ação desses fármacos. Sendo necessários novos experimentos para confirmar tais hipóteses. Porém, devido à pandemia do coronavírus, não foi possível realizar novos experimentos.

A BUP alterou significativamente o proteoma das células MO3.13. As principais proteínas alteradas se relacionaram com as vias bioquímicas e processos biológicos de resposta celular ao estresse, ciclo celular, transdução de sinais, exossoma extracelular, metabolismo de DNA e de proteínas (fig. 3 e 4). Destacamos as proteínas PRDX6 (peroxiredoxin-6) (fig. 2), RPL3 (60S ribosomal protein L3) (fig. 4), PSMC4 (26S proteasome regulatory subunit 6B) (fig. 4) e 14-3-3 gamma, sendo esta última uma das poucas proteínas com expressão reduzida (em nossos achados). Dentre as vias bioquímicas alteradas pelo tratamento com BUP, podemos ressaltar as que se referem à transdução de sinais, como resposta celular à estímulos externos e resposta celular ao estresse (fig. 3-B e 4). As células respondem a uma gama diversa de estímulos externos e a resposta a estes sinais se mostram essenciais para a manutenção da homeostase e desenvolvimento celular adequado (Kültz, 2005).

A PRDX6 (*Peroxiredoxin-6*) é uma proteína multifuncional que desempenha papel chave na proteção celular contra o estresse oxidativo e no metabolismo de fosfolipídios, além de também participar de vias de sinalização celular (Arevalo and Vázquez-Medina 2018). A PRDX6 mostrou-se mais expressa nos tratamentos com BUP. Em tecido cerebral post-mortem de pacientes com depressão psicótica esta proteína se mostrou pouco expressa (Martins-de-Souza et al. 2012) e em modelo animal de esclerose múltipla a expressão de PRDX6 potencializou a sobrevivência de OLD e preveniu a desmielinização na medula espinhal dos animais (Yun et al. 2015). Apesar de termos nos pautado em concentrações previamente testadas pelo ensaio MTT, pode ser que a BUP tenha exercido um insulto celular na linhagem estudada, gerando respostas celulares ao estresse. É cabível considerar também que essa droga talvez apresenta mecanismos estressores para as células MO3.13, sendo necessárias investigações mais profundas sobre esse potencial efeito em OLD.

Também foi observado o aumento de expressão e enriquecimento (fig. 6) da proteína PSMC4 (26S *proteasome regulatory subunit 6B*), uma subunidade do complexo enzimático proteassoma, que desempenha função essencial na seleção e degradação de proteínas mal formadas ou danificadas, sendo portanto, fundamental para a manutenção da homeostase proteica (Guo et al. 2016). Camundongos com uma deleção específica do gene PSMC4 em neurônio motor mostraram disfunção locomotora acompanhada por perda progressiva de neurônios motores e gliose (Tashiro et al. 2012). Diante disso, pode ser que o aumento da expressão de PSMC4 por BUP esteja contribuindo para a homeostase proteica de OLD MO3.13.

A proteína RPL3 (*60S ribosomal protein L3*) em nossos dados se mostrou mais expressa. A RPL3 participa da montagem da subunidade 60S dos ribossomos e é um componente essencial e indispensável para a formação do centro de peptidiltransferase, que por sua vez, é essencial para a formação de novas proteínas (Meskauskas and Dinman 2007; García-Gómez et al. 2014). No contexto da depressão, alterações nessa proteína também foram relatadas em análises post mortem da glândula pituitária de pacientes portadores da desordem (Stelzhammer et al. 2015).

O tratamento com BUP resultou em poucas proteínas com expressão diminuída. Dentre elas, é interessante destacar a proteína 14-3-3 gamma. Diversos estudos têm avaliado alterações nesta família de proteínas na esquizofrenia, entretanto ainda faltam trabalhos que avaliam o estado dessa no transtorno

depressivo maior (Stelzhammer et al. 2015; Rivero et al. 2015). No cérebro, essas proteínas modulam sinalizações intracelulares, processos de divisão e diferenciação das células, canais iônicos e neurodegeneração, além de também estarem implicadas em diversas neuropatologias, como Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington e esquizofrenia (Foote and Zhou, 2012). A proteína 14-3-3 gamma foi comumente encontrada alterada em tecido post mortem de pacientes com depressão, transtorno bipolar e esquizofrenia (Saia-Cereda et al. 2017). Em OLD, foi demonstrado que a proteína 14-3-3 gamma desempenha papel fundamental na mediação de vias de sinalização para proteção de OLD na neuroinflamação. Ratos modelo de esclerose múltipla com knockout dessa proteína apresentaram um aumento da apoptose de OLD, levando a maior perda dessas células e consequente aumento da desmielinização, lesão axonal, gliose e severidade da doença (Lee et al. 2015).

No tocante às vias relacionadas ao ciclo celular, foram observadas alterações nas proteínas presentes em vias responsáveis pela manutenção cromossomal, como montagem de nucleossomo e deposição da proteína A do centrômero (CENP-A), uma variante única da histona H3, também designada CenH3. A proteína CENP-A recém-sintetizada é depositada em nucleossomos nos centrômeros durante a fase tardia da telófase e G1 inicial do ciclo celular, conferindo estabilidade na associação dos nucleossomos com o centrômero e garantindo que estes sejam particionados igualmente durante a fase S (Dunleavy et al. 2009). A deposição desta variante em nucleossomos de centrômeros é essencial para a montagem do cinetócoro, bem como para a estabilidade cromossômica, além disso, falhas nesse processo podem estar associadas a transtornos mentais, envelhecimento e doenças degenerativas (Valdivia et al. 2009).

Em nossas análises, proteínas histonas essenciais, como variantes de H2A e H2B (fig. 6), que compõem a unidade básica da cromatina, o nucleossomo, mostraram-se mais expressas. No SNC a diversidade de subtipos neuronais e gliais, bem como a regulação gênica necessária para a plasticidade neural dependem fortemente de padrões precisos de regulação da cromatina e alterações nesse processo podem influenciar a estabilidade dos nucleossomos. Ainda, cabe destacar que uma ampla variedade de mecanismos epigenéticos, como modificação de histonas e remodelamento da cromatina, são fundamentais para modular os programas genéticos capazes de alterar e manter os estados celulares durante a proliferação e maturação de progenitoras de oligodendrócitos, bem como estabelecer a identidade e progressão de oligodendrócitos já maturados, tendo portanto implicações diretas nos processos de mielinização e reparo da mielina (Koreman, Sun, and Lu 2018; Berry, Wang, and Lu 2020).

Cabe ressaltar que também houveram alterações em proteínas relacionadas ao exossoma extracelular (fig. 3-C). As vesículas extracelulares secretadas por OLDs cumprem um importante papel neuroprotetor, pois participam da interação entre glia e axônio e proporcionam suporte aos neurônios permitindo que estes mantenham processos celulares vitais em condições de alta demanda (Reiter and Bongarzone 2020). Além disso, vesículas secretadas por OPCs podem desenvolver papel chave durante o neurodesenvolvimento, no reparo de circuitos neurais após injúrias e em processos de remielinização (Krämer-Albers 2020). Entender como os antidepressivos agem nesse sistema pode revelar novas perspectivas sobre as interações OLD-axônio e consequente modulação da integridade neuronal dentro do contexto da depressão.

Nossos resultados mostraram que a realização de estudos com modelos *in vitro*, associado à análise proteômica em larga escala possibilitou a identificação de algumas vias, processos biológicos e proteínas relacionadas com as alterações provocadas pela BUP. Isso permite uma melhor compreensão sobre os mecanismos de ação deste antidepressivo em OLD. Identificamos algumas vias alvo que podem ser investigadas mais a fundo em novas condições experimentais com esta droga. Novas condições experimentais também seriam necessárias para adquirir resultados mais robustos com relação às FLX e NOR. Portanto, é

ainda necessário o desenvolvimento de mais estudos para melhor compreender os mecanismos de ação das classes de SSRIs, NDRIs e TCAs em oligodendrócitos MO3.13.

Referências

- Arevalo, José A., and José Pablo Vázquez-Medina. 2018. "The Role of Peroxiredoxin 6 in Cell Signaling." *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 7 (12). <https://doi.org/10.3390/antiox7120172>.
- Berry, Kalen, Jiajia Wang, and Q. Richard Lu. 2020. "Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Myelination in Developmental Disorders and Neurodegenerative Diseases." *F1000Research* 9 (February). <https://doi.org/10.12688/f1000research.20904.1>.
- Dunleavy, Elaine M., Danièle Roche, Hideaki Tagami, Nicolas Lacoste, Dominique Ray-Gallet, Yusuke Nakamura, Yataro Daigo, Yoshihiro Nakatani, and Geneviève Almouzni-Pettinotti. 2009. "HJURP Is a Cell-Cycle-Dependent Maintenance and Deposition Factor of CENP-A at Centromeres." *Cell* 137 (3): 485–97.
- Foote, M. and Zhou, Y. (2012) '14-3-3 proteins in neurological disorders', *International journal of biochemistry and molecular biology*, 3(2), pp. 152–164.
- García-Gómez, Juan J., Antonio Fernández-Pevida, Simon Lebaron, Iván V. Rosado, David Tollervey, Dieter Kressler, and Jesús de la Cruz. 2014. "Final Pre-40S Maturation Depends on the Functional Integrity of the 60S Subunit Ribosomal Protein L3." *PLoS Genetics* 10 (3): e1004205.
- Guo, Xing, Xiaorong Wang, Zhiping Wang, Sourav Banerjee, Jing Yang, Lan Huang, and Jack E. Dixon. 2016. "Site-Specific Proteasome Phosphorylation Controls Cell Proliferation and Tumorigenesis." *Nature Cell Biology* 18 (2): 202–12.
- Koreman, Elijah, Xiaowei Sun, and Q. Richard Lu. 2018. "Chromatin Remodeling and Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Myelination and Myelin Repair." *Molecular and Cellular Neurosciences* 87 (March): 18–26.
- Krämer-Albers, Eva-Maria. 2020. "Extracellular Vesicles in the Oligodendrocyte Microenvironment." *Neuroscience Letters* 725 (April): 134915.
- Lee, De-Hyung, Petra Steinacker, Silvia Seubert, Tanja Turnescu, Arthur Melms, Arndt Manzel, Markus Otto, and Ralf A. Linker. 2015. "Role of Glial 14-3-3 Gamma Protein in Autoimmune Demyelination." *Journal of Neuroinflammation* 12 (October): 187.
- Martins-de-Souza, D., P. C. Guest, L. W. Harris, N. Vanattou-Saifoudine, M. J. Webster, H. Rahmoune, and S. Bahn. 2012. "Identification of Proteomic Signatures Associated with Depression and Psychotic Depression in Post-Mortem Brains from Major Depression Patients." *Translational Psychiatry* 2 (March): e87.
- Meskauskas, Arturas, and Jonathan D. Dinman. 2007. "Ribosomal Protein L3: Gatekeeper to the A Site." *Molecular Cell* 25 (6): 877–88.
- Reiter, Cory R., and Ernesto R. Bongarzone. 2020. "The Role of Vesicle Trafficking and Release in Oligodendrocyte Biology." *Neurochemical Research* 45 (3): 620–29.
- Rivero, Guadalupe, Ane M. Gabilondo, Jesús A. García-Sevilla, Romano La Harpe, Benito Morentín, and J. Javier Meana. 2015. "Up-Regulated 14-3-3 β and 14-3-3 ζ Proteins in Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia: Effect of Psychotropic Treatment." *Schizophrenia Research* 161 (2-3): 446–51.
- Saia-Cereda, Verônica M., Juliana S. Cassoli, Daniel Martins-de-Souza, and Juliana M. Nascimento. 2017. "Psychiatric Disorders Biochemical Pathways Unraveled by Human Brain Proteomics." *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 267 (1): 3–17.
- Stelzhammer, Viktoria, Murtada Alsaif, Man K. Chan, Hassan Rahmoune, Hannah Steeb, Paul C. Guest, and Sabine Bahn. 2015. "Distinct Proteomic Profiles in Post-Mortem Pituitary Glands from Bipolar Disorder and Major Depressive Disorder Patients." *Journal of Psychiatric Research* 60 (January): 40–48.
- Tashiro, Yoshitaka, Makoto Urushitani, Haruhisa Inoue, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, et al. 2012. "Motor Neuron-Specific Disruption of Proteasomes, but Not Autophagy, Replicates Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.417600>.
- Valdivia, Manuel M., Khaoula Hamdouch, Manuela Ortiz, and Antonio Astola. 2009. "CENPA a Genomic Marker for Centromere Activity and Human Diseases." *Current Genomics* 10 (5): 326–35.
- Yun, Hyung-Mun, Kyung-Ran Park, Eun-Cheol Kim, and Jin Tae Hong. 2015. "PRDX6 Controls Multiple Sclerosis by Suppressing Inflammation and Blood Brain Barrier Disruption." *Oncotarget* 6 (25): 20875–84.