



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Sofia Pereira de Sousa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Neuro- and chronobiology of depression coupled to genetic polymorphisms of enzymes determine disease evolution and drug resistance?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Zulmira Lima, do Dr. João Serra e da Professora Doutora Ana Cristina Bairrada Fortuna apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Sofia Pereira de Sousa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Neuro- and chronobiology of depression coupled to genetic polymorphisms of enzymes determine disease evolution and drug resistance?” referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Zulmira Lima, do Dr. João Serra e da Professora Doutora Ana Cristina Bairrada Fortuna apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2019

Eu, Ana Sofia Pereira de Sousa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2014215813, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Neuro- and chronobiology of depression coupled to genetic polymorphisms of enzymes determine disease evolution and drug resistance?” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 3 de setembro de 2019.

Ana Sofia Sousa

(Ana Sofia Pereira de Sousa)

Agradecimentos

À **Professora Doutora Ana Fortuna**, um obrigada será insuficiente para agradecer todo o carinho, total disponibilidade e motivação contínua, não só na realização do presente trabalho, mas também ao longo de todo o percurso académico.

À **Dra. Zulmira Lima**, diretora técnica da Farmácia Lima, um especial agradecimento pela amabilidade, exemplo de profissionalismo e por toda a sabedoria transmitida.

À **Helena, Marco, Dra. Marta, Dra. Catarina, Dra. Sara, Dra. Andreia e Iva**, agradeço toda a dedicação, simpatia e confiança que depositaram em mim.

Ao **Dr. João Serra**, agradeço a oportunidade de integrar o estágio no departamento de I&D do Labor Qualitas, bem como o excelente acolhimento e profissionalismo demonstrados.

À **Dra. Paula Relógio**, um especial agradecimento pela incansável orientação, disponibilidade e partilha de conhecimento. Sem dúvida que esta experiência se tornou mais enriquecedora graças à dedicação espelhada no seu trabalho diário.

Aos meus **pais e irmã**, obrigada por embarcarem comigo nesta jornada. Serão sempre o meu porto de abrigo, o lugar mais seguro e onde voltarei sempre.

Rafael, a ti agradeço o incansável apoio. Obrigada por caminhares lado a lado comigo e não me deixares desistir nunca.

Aos **amigos**, os de sempre e aqueles com os quais tive a sorte de me cruzar ao longo destes 5 anos, agradeço por toda a paciência e incentivo. Sem vocês, nada disto seria possível.

Coimbra, minha eterna cidade, levar-te-ei sempre comigo.

Índice

Capítulo I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	7
1. Introdução.....	9
2. Farmácia Lima.....	10
3. Análise SWOT	11
3.1. Pontos Fortes.....	12
3.1.1. Integração pela equipa técnica.....	12
3.1.2. Diversidade das funções desempenhadas.....	12
3.1.3. Diversidade de produtos de dermocosmética e puericultura.....	13
3.2. Pontos Fracos	14
3.2.1. Preparação de manipulados.....	14
3.3. Oportunidades.....	14
3.3.1. Avanço Tecnológico.....	14
3.3.2. Prestação de serviços farmacêuticos fora da farmácia	16
3.3.3. Diversidade de utentes.....	16
3.4. Ameaças	17
3.4.1. Medicamentos esgotados.....	17
3.4.2. Superfícies de venda concorrentes.....	17
4. Casos Clínicos.....	18
5. Conclusão.....	20
6. Referências Bibliográficas.....	21
7. Anexo.....	22

Capítulo II - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	24
1. Introdução.....	25
2. Grupo Tecnimede	25
3. Análise SWOT	27
3.1. Pontos Fortes.....	27
3.1.1. Integração e acompanhamento.....	27
3.1.2. Diversidade de tarefas desempenhadas	28
3.1.3. Rigor no cumprimento das regras laboratoriais	29
3.1.4. Aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do MICE.....	30
3.1.5. Gestão de tempo	30

3.2.	Pontos Fracos	31
3.2.1.	Duração do estágio	31
3.2.2.	Falta de contacto com outros departamentos.....	31
3.3.	Oportunidades.....	31
3.3.1.	Contacto com diversos equipamentos laboratoriais.....	31
3.3.2.	Formação interna contínua.....	32
3.4.	Ameaças	32
3.4.1.	<i>Deadlines</i> estreitos	32
3.4.2.	O custo da inovação	33
4.	Conclusão.....	33
5.	Referências Bibliográficas.....	34

Capítulo III - Monografia "“Neuro- and chronobiology of depression coupled to genetic polymorphisms of enzymes determine disease evolution and drug resistance?”

List of Abbreviations	36
Resumo	38
Abstract	39
1. Introduction.....	40
2. Depression and common types of depression	41
2.1. Major Depressive Disorder (MDD)	41
2.2. Seasonal Affective Disorder (SAD).....	41
2.3. Bipolar disorder (BD)	42
2.4. Persistent Depressive Disorder (PDD)	42
2.5. Treatment-resistant depression (TRD)	42
3. Neurobiology of depression	43
3.1. Dysfunction of monoamine neurotransmission	43
3.2. Neurotrophic hypothesis: neurogenesis and neuroplasticity disturbance	44
3.3. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysfunction	45
3.4. Immuno-inflammation	46
3.5. Glutamatergic system.....	51
3.6. Circadian rhythms dysfunction	52
4. Chronobiological theories.....	53
4.1. REM and non-REM sleep	53
4.2. Melatonin and core body temperature (CBT)	54

4.3. Cortisol	55
4.4. Genetic mechanisms.....	56
5. Genetic polymorphism of enzymes on depression.....	61
5.1. Cytochrome P450 (CYP450) enzymes	61
5.2. Transporters superfamilies	63
6. Conclusions and future perspectives	66
References.....	68

CAPÍTULO I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Lista de Abreviaturas

ANF	Associação Nacional das Farmácias
CASM	Centro de Apoio Social de Mozelos
FEFO	<i>First-Expire First-Out</i>
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
GAP	Gabinete de Atendimento Personalizado
IMC	Índice de Massa Corporal
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamento não sujeito a receita médica
MSRM	Medicamento sujeito a receita médica
PNV	Plano Nacional de Vacinação
SWOT	Pontos Fortes, Ponto Fracos, Oportunidades e Ameaças, do inglês <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>
USF	Unidade de Saúde Familiar

I. Introdução

O fascínio pela área farmacêutica acompanha-me desde cedo, quer pelo domínio da ciência e da inovação, quer pela sua envolvência com a sociedade que acredito que deve ser centrada no utente e nos serviços a ele dedicados.

O farmacêutico é visto como o elo entre o utente e a sociedade que o rodeia, disponibilizando os serviços essenciais à sua saúde e bem-estar. Este tem o dever de dar primazia ao máximo benefício terapêutico, melhorando o acesso aos cuidados de saúde^[1]. Enquanto especialistas do medicamento e agentes de saúde pública, os farmacêuticos devem atualizar continuamente os seus conhecimentos técnicos e científicos de modo a que as funções que lhe são atribuídas sejam realizadas com o rigor científico que é exigido^[1,2].

É de prestigiar a oportunidade que o plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) oferece aos seus estudantes, na medida em que proporciona um estágio curricular completo, integrado e diversificado, permitindo aos alunos perceberem o papel do farmacêutico e a sua relevância na comunidade.

Neste sentido, serve o presente relatório para legitimar a minha experiência ao longo do estágio curricular na Farmácia Lima (Figura 1), realizado durante os meses de janeiro a abril de 2019 sob a orientação da diretora técnica da farmácia, a Dra. Zulmira Lima.

Esta análise é apresentada sob a forma de um modelo SWOT (Figura 2) que engloba uma dimensão interna, representada pelos Pontos Fortes (*Strengths*) e Pontos Fracos (*Weaknesses*) bem como uma dimensão externa onde se incluem as Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) verificadas ao longo desta experiência^[3].

2. Farmácia Lima

A Farmácia Lima, localizada no coração da cidade de Lourosa, no concelho de Santa Maria da Feira, tem como principal missão prestar serviços de excelência e qualidade, pautando-se pelo rigor e proximidade ao utente de modo a melhorar continuamente a sua qualidade de vida e bem-estar.

O espaço contempla uma área de atendimento ao público e uma zona de *back office*. A zona de atendimento ao público é composta por três balcões de atendimento cada um com dois postos de trabalho e um gabinete de atendimento personalizado (GAP). O GAP destina-se à medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, sessões de nutrição, podologia e massagem terapêutica, administração de vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação (PNV) e injetáveis ao abrigo do protocolo da Associação Nacional de Farmácias (ANF), bem como formação da equipa técnica. Durante o período de estágio, tive a oportunidade de acompanhar a equipa da Farmácia Lima em diferentes momentos de formação, os quais discrimino em anexo.

Na zona de *back office* encontra-se uma área destinada à realização, receção e conferência de encomendas com ligação direta ao exterior da farmácia por uma porta de serviço de modo a facilitar a entrada das mesmas. Neste espaço, encontra-se também o *robot* para armazenamento e dispensa dos medicamentos, o laboratório para preparação de medicamentos manipulados e reconstituição de suspensões, uma zona de descanso e instalações sanitárias. A farmácia dispõe ainda de um escritório da direção técnica onde se realizam as tarefas relacionadas com a gestão da farmácia.

A equipa técnica da Farmácia Lima é composta por cinco farmacêuticos, incluindo a Diretora Técnica, dois técnicos de farmácia e auxiliares, que prestam serviços ao nível da receção de encomendas e manutenção do espaço da farmácia.



Figura 1. Fotografia do exterior da Farmácia Lima.

3. Análise SWOT



Figura 2. Representação esquemática da análise SWOT referente ao estágio curricular realizado na Farmácia Lima.

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Integração pela equipa técnica

A Farmácia Lima é composta por uma equipa unida e experiente que preza pelo profissionalismo, competência e contínua dedicação ao utente. A sua indubitável simpatia despoleta um sentimento de confiança no utente, para que se sinta à vontade na exposição das suas dúvidas e/ou problemas. A equipa tem a sua própria organização interna, estando cada um dos elementos responsável por determinadas tarefas como, por exemplo, controlo de prazos de validade, gestão e regularização de devoluções, controlo das condições de temperatura e humidade do frigorífico e *robot*, receção de encomendas, montagem e fecho do contentor da Valormed e gestão das redes sociais e plataformas digitais. Esta organização interna coordenada permite uma maior eficiência na execução das tarefas.

Desde o primeiro dia do estágio, toda a equipa técnica demonstrou disponibilidade para me acompanhar ao longo das várias tarefas desempenhadas, bem como me esclarecer quanto às dúvidas que foram surgindo. Criaram-se excelentes relações interpessoais, o que facilitou a minha aprendizagem e aquisição de autonomia no desenrolar das diferentes funções. Assim, considero este aspeto um ponto forte de extrema relevância no estágio, uma vez que o ambiente saudável e de entreaajuda com que fui brindada ao longo do estágio me permitiu adquirir inúmeras competências profissionais e pessoais que se revelarão úteis no futuro profissional.

3.1.2. Diversidade das funções desempenhadas

O farmacêutico é um profissional responsável por inúmeras funções ao nível da farmácia comunitária, refletindo-se o desempenho das suas tarefas na saúde e bem-estar do utente. Ao longo dos quatro meses de estágio tive oportunidade de desempenhar diversas funções que me dotaram de competências enquanto futura farmacêutica, entre as quais:

- a) Realização, receção e armazenamento de encomendas. Esta é uma tarefa basilar em farmácia comunitária e deve ser realizada da forma mais rigorosa possível para permitir um bom aprovisionamento e gestão de *stocks*.
- b) Atendimento e aconselhamento ao utente. Trata-se do pilar central da atividade farmacêutica. Saber comunicar e escutar o utente constitui o primeiro passo para demonstrar disponibilidade e interesse pela resolução dos seus problemas. É imprescindível que o profissional de saúde se adapte a cada utente e apresente uma

- postura recetiva e de acolhimento, bem como uma linguagem simplificada na transmissão de informação complementar à dispensa de medicamentos sujeitos ou não sujeitos a receita médica (MSRM e MNSRM) ou mesmo de medidas não farmacológicas.
- c) Medição de parâmetros antropométricos (peso, altura, índice de massa corporal (IMC) e perímetro abdominal), fisiológicos (pressão arterial sistólica e diastólica e frequência cardíaca) e bioquímicos (colesterol total, glicémia, triglicédeos e ácido úrico). Este tipo de procedimentos permite monitorizar e avaliar o risco de algumas patologias como a doença cardiovascular e realizar um aconselhamento tanto a nível farmacológico como não farmacológico.
 - d) Gestão de *stocks* e controlo de prazos de validade. Estes são realizados periodicamente tendo em conta alguns fatores como a procura e rotatividade dos produtos.

Estou certa de que a diversidade de funções que desempenhei fará de mim uma profissional de saúde mais atenta e qualificada.

3.1.3. Diversidade de produtos de dermocosmética e puericultura

A dermocosmética e puericultura são áreas de constante procura por parte do utente, sendo as preocupações estéticas e de bem-estar cada vez mais valorizadas. Na Farmácia Lima, estas áreas são fortemente privilegiadas, existindo uma grande diversidade de marcas e linhas com as quais os utentes podem ter contacto e adequar às suas necessidades.

Ao nível dos produtos de cuidado de bebé e criança, a farmácia dispõe de uma pluralidade de escolha, desde alimentação, cuidados de higiene e hidratação, cuidados de muda da fralda e mesmo cuidados específicos para problemas como dermatite da fralda, crosta láctea, dermatite atópica, eczema perioral, entre outros. Também os cuidados da mamã são uma preocupação para a farmácia, que dispõe de um conjunto de produtos essenciais, tais como soutiens e discos de amamentação, cuidados do mamilo, discos de hidrogel, faixas e cintas pré e pós-parto.

Paralelamente, no campo da dermocosmética, a grande variedade procura responder às preferências do utente, não esquecendo as suas capacidades económicas. Esta engloba, para além de produtos de limpeza e hidratação, gamas premium, gamas antienvhecimento e gamas medicalizadas para uma pele com dermatite seborreica, prurido, cicatrizes, queratoses, vermelhidão, descamação, hiperpigmentação, entre outros. Adicionalmente, são ainda disponibilizados produtos no âmbito dos cuidados complementares (máscaras, cremes de

mãos, proteção solar), cuidados corporais específicos (anti celulíticos, antiestrias e reafirmantes) e cuidados capilares (champôs para estados descamativos e anti queda).

O contacto e aconselhamento personalizado ao utente no âmbito destas áreas, com especial foco no seu bem-estar, permitiu-me adquirir e consolidar valências que considero importantes para a minha formação.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Preparação de manipulados

Segundo a Portaria n.º 594/2004, de 2 de junho, um medicamento manipulado é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”. O farmacêutico tem a responsabilidade de garantir a qualidade e a segurança das preparações e estas devem ser realizadas segundo as Boas Práticas de Preparação de Manipulados apenas pelo farmacêutico diretor técnico ou sob a sua supervisão^[4].

A preparação de medicamentos manipulados é uma das atividades que mais confere reconhecimento e notoriedade à profissão farmacêutica. No que toca à Farmácia Lima, a preparação de manipulados é cada vez menos realizada dado o decréscimo da sua requisição, quer pelo regime de comparticipação em vigor, quer pela massificação da produção de medicamentos a nível industrial, o que acaba, muitas das vezes, por colmatar as necessidades da população. Assim, verifica-se uma dificuldade na gestão de *stocks* das matérias primas e consequente decréscimo da rentabilidade da produção de medicamentos manipulados para a farmácia. Posto isto, em caso de necessidade de formulação de um manipulado, a Farmácia Lima solicita a sua preparação a outra farmácia.

De acordo com o referido, considero que este foi o principal ponto fraco do meu estágio na medida em que, na minha ótica, esta é uma tarefa de elevado prestígio para o farmacêutico com a qual gostaria de ter tido mais contacto.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Avanço Tecnológico

A constante atualização e inovação são ferramentas fulcrais no dia a dia da Farmácia Lima. Esta dispõe de um conjunto de tecnologias que permite não só rentabilizar o tempo destinado ao atendimento, bem como manter um maior e mais personalizado contacto com o utente.

Para além do *robot*, destacam-se ainda a impressora de etiquetas personalizadas de posologia, o *cashlogy*, o painel LED e a presença de *tablets* em cada posto de atendimento.

O *robot*, um sistema de armazenamento e dispensa de medicamentos automatizado, permite armazenar uma elevada quantidade de produtos de saúde, cerca de 22.000 unidades, numa pequena área com condições controladas de humidade e temperatura através de um termohigrómetro. Para além disso, possibilita uma gestão mais eficaz de *stocks* e de prazos de validade pela política “*First-Expire, First-Out*” (*FEFO*) que consiste em dispensar em primeiro lugar os produtos cujo prazo de validade é mais curto. Uma vez que se trata de um local restrito, garante o devido armazenamento dos medicamentos psicotrópicos, sem que seja necessário recorrer a um armário fechado.

A impressora de etiquetas personalizadas de posologia, quando associada às receitas eletrónicas, imprime textualmente, sob a forma de uma etiqueta autocolante, a posologia prescrita pelo médico. No caso das receitas manuais, a impressão da etiqueta também é possível, apesar de ser necessário digitar a posologia. Esta ferramenta constitui uma mais valia, uma vez que auxilia o farmacêutico perante a dificuldade em escrever nas caixas plastificadas e, acima de tudo, possibilita ao utente a fácil leitura da posologia, que lhes permite cumprir a terapêutica corretamente.

De modo a favorecer a segurança, diminuir a ocorrência de erros de operação pessoal e erros na gestão de trocos, a Farmácia Lima dispõe de um *chashlogy*, uma caixa automática de pagamentos que simplifica os processos de gestão de caixa controlando as moedas e notas falsas em caso de fraude.

Por fim, a tecnologia LED permite a exibição de conteúdos digitais promocionais tanto durante o dia como durante a noite, nomeadamente campanhas de sensibilização, divulgação de serviços e a exposição do horário mensal e dias de serviço da farmácia, sendo um apelativo meio de divulgação destes conteúdos e, simultaneamente, capaz reduzir significativamente a quantidade de papel utilizado. A par desta estratégia publicitária, a Farmácia Lima também dispõe de *tablets* em cada posto de atendimento com a publicitação dos mesmos conteúdos do painel LED, bem como de questionários de modo a avaliar a satisfação do utente, que posteriormente poderão ser usados para realização de sondagens.

3.3.2. Prestação de serviços farmacêuticos fora da farmácia

Ser farmacêutico vai muito além do âmbito do medicamento e dos limites da farmácia. Ser farmacêutico é ser um agente de saúde pública sempre pronto a servir a sociedade. Neste âmbito, destaco o apoio nos cuidados de saúde no Centro Social de Lourosa e no Centro de Apoio Social de Mozelos (CASM). Estas são instituições de solidariedade social que têm como principal missão acolher pessoas idosas e pessoas em situações de dependência física ou psíquica.

No decorrer do estágio tive oportunidade de auxiliar a equipa da Farmácia Lima na ida ao Centro Social de Lourosa onde é realizado um acompanhamento personalizado e contínuo a todos os utentes. Tive a possibilidade de efetuar a determinação de parâmetros bioquímicos como a glicémia, colesterol e triglicéridos e parâmetros fisiológicos como a medição da pressão arterial. Para além disso, também é feito um aconselhamento individual, gestão da terapêutica instituída a cada utente sendo toda a informação registada de modo a que, futuramente, possa ser reavaliada e apresentada ao médico. Por sua vez, a parceria com o CASM assenta na dispensa e entrega de medicação necessária aos utentes do lar, mediante diagnóstico e prescrição médica.

Estas experiências revelaram-se extremamente enriquecedoras uma vez que me permitiram contactar e compreender contextos diferentes daqueles vivenciados no quotidiano da farmácia comunitária.

3.3.3. Diversidade de utentes

Inserida num local privilegiado, junto à Unidade de Saúde Familiar (USF) de Lourosa, a Farmácia Lima abrange uma grande variedade de utentes de diferentes faixas etárias, embora predominem idosos do sexo feminino. Para além disso, são visíveis as diferentes classes socioeconómicas, o que diversificou o conjunto de situações clínicas com que me deparei no decorrer do estágio e face às quais fui solicitada a dar uma resposta. Como tal, procurei sempre adequar e personalizar o meu discurso de acordo com o público-alvo, recorrendo à análise de fatores como a idade, grau de literacia e poder de compra que se revelaram preponderantes no momento do atendimento. Todos estes aspetos permitiram o aumento dos meus conhecimentos e desenvolvimento de competências úteis na criação de uma profícua relação farmacêutico-utente.

3.4. Ameaças

3.4.1. Medicamentos esgotados

Durante o período de estágio assisti a ruturas sistemáticas de *stock* de muitos medicamentos, sendo este um obstáculo à prestação de cuidados e serviços de saúde, uma vez que alguns destes fármacos são utilizados para o tratamento de patologias crónicas como a diabetes ou asma, muitas das vezes sem alternativa terapêutica. Causas de natureza diversa, como a quebra na produção, a falha na distribuição grossista e até mesmo exportação paralela estão na base deste problema.

Nestas situações, agi contactando sempre os armazéns com os quais a Farmácia Lima tem relação comercial, de modo a perceber se poderiam ter alguma embalagem disponível. Em caso de insucesso, foi proposto ao utente a substituição por um genérico ou outro laboratório ou solicitação ao médico de uma alternativa passível de se adaptar à sua situação, que mesmo não sendo a sua preferência inicial, fosse igualmente capaz de colmatar as suas necessidades terapêuticas.

Estas situações insustentáveis, fora do controlo dos farmacêuticos, tornam-se na maioria das vezes incompreensíveis para o utente, obrigando a esforços redobrados na tentativa de justificar esta falha.

3.4.2. Superfícies de venda concorrentes

O facto dos MNSRM serem vendidos em espaços fora das farmácias, fez com que o mercado se tornasse mais competitivo e a profissão do farmacêutico menos valorizada. Uma vez que estes locais se encontram muito acessíveis, há uma tendência crescente para recorrer aos mesmos em detrimento da farmácia. Aliado ao facto de estes espaços estarem habitualmente associados a grandes superfícies de venda que investem em grandes quantidades de produtos, estamos perante locais onde se praticam preços drasticamente reduzidos, quando comparados aos preços mais baixos que uma farmácia é capaz de suportar de modo a não colocar em causa a sua boa gestão. Estes espaços de venda são igualmente uma das justificações para a crescente banalização do medicamento a que assistimos. A fácil acessibilidade dos MNSRM fomenta a desvalorização do ato farmacêutico e do papel interventivo que o mesmo tem na sociedade, promovendo o desconhecimento acerca dos benefícios e dos riscos da utilização destes medicamentos, podendo mesmo levar a uma automedicação desmedida que nos coloca perante um problema de saúde pública. As farmácias distinguem-se dos restantes espaços de

venda de MNSRM pela qualidade e competência refletidas nos serviços de saúde prestados, sendo esta a chave para a consolidação de uma posição de destaque junto da sociedade. Dada a enorme concorrência, é cada vez mais importante que o farmacêutico comunitário se afirme enquanto detentor de competências para garantir a eficácia e segurança nos seus aconselhamentos, bem como no ato de dispensa de medicamentos.

4. Casos Clínicos

Caso Clínico I – "Dermatite da fralda"

Utente, do sexo feminino, com cerca de 35 anos, dirige-se à farmácia pedindo um aconselhamento para o seu bebé de 7 meses que apresenta "assadura da fralda".

Depois de questionar a utente acerca dos sintomas e possível causa, a mesma refere que o bebé apresenta vermelhidão, irritação, presença de borbulhas na zona da fralda e que, provavelmente, se deve ao nascimento dos primeiros dentes que desencadearam a ocorrência de "fezes mais líquidas".

A dermatite da fralda é uma afeção dermatológica muito comum e cuja causa principal é contacto continuado com agentes biológicos como a urina e as fezes. Adicionalmente, também as alterações ao nível da alimentação com introdução de novos alimentos e a primeira dentição, frequentemente acompanhada por aumento de produção de muco gástrico que tornam as fezes mais líquidas e ácidas, aumentam a propensão à dermatite da fralda. Esta situação torna a barreira cutânea mais vulnerável a infeções provocadas por bactérias ou fungos.

Deste modo, aconselhei o uso de uma pomada reparadora Nutraisdin AF[®], composta pela associação de óxido de zinco, com ação cicatrizante e regeneradora, e miconazol, com propriedades antifúngicas, que atua criando uma barreira protetora na zona da fralda e diminui a irritação ajudando a controlar a proliferação microbiana. Informei que fosse aplicada uma camada fina e homogénea na região durante 7 dias alertando para a necessidade de consultar o médico, caso a irritação persistisse após 7 dias^[5].

Para finalizar, aconselhei outros cuidados tais como a limpeza com compressas e linimento e o uso de água termal de modo a aliviar o desconforto do bebé. Alertei ainda a mãe para a importância da hidratação da pele do bebé, uma vez que a barreira cutânea é mais sensível e imatura. Em caso de irritação e dor nas gengivas, recomendei o uso de um gel gengival com efeito calmante e refrescante para a proteção das gengivas.

Caso Clínico 2 – "Sintomas de constipação e tosse"

Utente com cerca de 55 anos, sexo masculino, manifesta queixas de nariz entupido e tosse. Depois de tentar perceber a etiologia e o tipo de tosse, questionei se o utente tinha algum problema de saúde como hipertensão ou diabetes. Este referiu ser diabético e que a tosse que apresentava era uma tosse com expetoração, bem como dor e irritação ao nível da garganta.

Posto isto, aconselhei a toma de um xarope para a tosse, o Bisolvon[®] Linctus Adulto, na posologia de 5 ml três vezes por dia. Este é composto por Cloridrato de Bromexina, substância ativa com ação expetorante e mucolítica, que reduz a viscosidade das secreções brônquicas, facilitando assim a sua eliminação^[6]. Relativamente à congestão nasal, aconselhei um descongestionante tópico de longa duração, o Vibrocil Actilong[®] (xilometazolina) sob a forma de nebulizador, para exercer um efeito constritor dos vasos sanguíneos nasais. Recomendei uma pulverização em cada narina até três vezes ao dia alertando para que o seu uso não fosse superior a 10 dias consecutivos, de modo a evitar o efeito *rebound*^[7]. Para o alívio da dor e irritação da garganta indiquei as pastilhas Strepfen[®] Laranja sem açúcar, na toma máxima diária de 5 pastilhas, que contém flurbiprofeno, substância ativa com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias^[8].

Por fim, foram aconselhadas medidas não farmacológicas como hidratação adequada, lavagem das fossas nasais com soro fisiológico ou spray nasal salino, nomeadamente antes da aplicação do Vibrocil Actilong[®]. Alertei ainda para que se, após 5 a 7 dias de tratamento não houvesse alívio dos sintomas, fosse referenciado ao médico.

¹ Predisposição de um fármaco para provocar o retorno e aumento dos sintomas que estão a ser tratados, devido ao seu uso por um longo período de tempo.

5. Conclusão

O estágio curricular realizado na Farmácia Lima, ao longo de três meses, permitiu-me adquirir uma visão global de todas as tarefas inerentes à prática farmacêutica, aplicando e consolidando os conhecimentos teóricos previamente adquiridos ao longo do meu percurso acadêmico. O farmacêutico é, sem dúvida, o profissional de saúde com maior proximidade ao utente, encontrando-se numa posição singular para colocar em prática um serviço com qualidade e de confiança, capaz de responder às necessidades e particularidades de cada utente.

Esta experiência não seria tão gratificante sem o acompanhamento de toda a equipa técnica da farmácia que contribuiu, desde o início, para a minha constante aprendizagem. Como pilar desta etapa, destaco os valores que me foram transmitidos e que, conseqüentemente, me permitiram alcançar autonomia e diversas competências profissionais e pessoais, que me fizeram perceber que, enquanto futura farmacêutica, poderei desempenhar um papel ativo na saúde e bem-estar da comunidade.

6. Referências Bibliográficas

- 1- ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Boas Práticas de Farmácia Comunitária: Norma geral sobre o farmacêutico e pessoal de apoio.** (2015) [Acedido a 4 de março de 2019] Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_geral_sobre_o_farmacutico_e_o_pessoal_de_apoio_5695580485ab147f4836e5.pdf
- 2- PITA, JR., BELL, V. – **A farmácia em Portugal nos últimos 30 anos. Algumas reflexões sobre a farmácia de oficina ou comunitária.** Debater a Europa (2016) 197-215. [Acedido a 7 de março de 2019] Disponível na Internet: <https://core.ac.uk/download/pdf/151538428.pdf>
- 3- IAPMEI – **A análise SWOT.** (2016) [Acedido a 18 de março de 2019]. Disponível na Internet: <http://iapmei.innovagencyhost.com/getattachment/PRODUTOS-E-SERVICOS/Empreendedorismo-Inovacao/Empreendedorismo/Guias-praticos/A-analise-SWOT.pdf.aspx>
- 4- Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho de 2004 do Ministério da Saúde, Diário da República n.º 129/2004, Série I-B de 2 de Junho de 2004. [Acedido a 21 de março de 2019] Disponível na Internet: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/261875/details/maximized>
- 5- ISDIN – **Nutraisdin AF Pomada reparadora.** [Acedido a 25 de março de 2019] Disponível na Internet: <https://www.isdin.com/pt-PT/produto/nutraisdin/af-pomada-reparadora>
- 6- INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento: Bisolvon Linctus Adulto** [Acedido a 25 de março de 2019] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=36696&tipo_doc=rcm
- 7- INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento: Vibrocil Actilong** [Acedido a 25 de março de 2019] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6548&tipo_doc=rcm
- 8- INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento: Strepfen laranja sem açúcar** [Acedido a 25 de março de 2019] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=53219&tipo_doc=rcm

7. Anexo

Tabela I. Resumo da participação em ações de formação ao longo do estágio na Farmácia Lima

Ações de formação	
Data	Entidade e Tema
25 de janeiro	<i>Mypharma</i> : Formação Suplementos Alimentares
4 de fevereiro	<i>Silfarma</i> : Formação Suplementos Alimentares
7 de março	<i>Zambon</i> : “Muco”
18 de março	<i>Natiris</i> : Formação Suplementos Alimentares Cerebrum
21 de março	<i>Cooprofar</i> : “Fórum Farmácia Porto 2019” - Dermatologia: “Dermatoses cutâneas” – casos clínicos - Oftalmologia: “Olho vermelho” – casos clínicos

CAPÍTULO II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica



Lista de Abreviaturas

APA	Análise de Produto Acabado
DCC	Departamento de Cultura de Células
DF	Desenvolvimento Farmacêutico
DQF	Departamento de Química Fina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I&D	Investigação e Desenvolvimento
IET	Instruções Específicas de Trabalho
IGQ	Instruções Gerais da Qualidade
LE	Laboratório de Ensaios
LQ	Labor Qualitas
MG	Medicamento Genérico
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MR	Medicamento de Referência
OEP	Operações de Equipamentos e de Processos
QUA	Qualidade
SNC	Sistema Nervoso Central
SWOT	Pontos Fortes, Ponto Fracos, Oportunidades e Ameaças, do inglês <i>Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats</i>
TEC	Técnicas
VPF	Validação do Processo de Fabrico

1. Introdução

Para além da realização de um estágio obrigatório em Farmácia Comunitária, o plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) possibilita aos alunos a realização de um estágio numa área distinta permitindo o contacto com outros setores do mercado farmacêutico e, assim, aplicar, em contexto real, os conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico.

Como a vertente laboratorial sempre foi a que mais interesse e curiosidade me despertou, optei por integrar no meu plano um estágio em indústria farmacêutica, realizado no Grupo Tecnimede de maio a julho de 2019 sob a orientação do Dr. João Serra e da Dra. Paula Relógio.

Posto isto, o presente relatório tem como objetivo descrever o meu estágio sob a forma de um modelo SWOT (Figura 3) que engloba uma dimensão interna, representada pelos Pontos Fortes (Strengths) e Pontos Fracos (Weaknesses) bem como uma dimensão externa onde se incluem as Oportunidades (Opportunities) e Ameaças (Threats) verificadas ao longo desta experiência.

2. Grupo Tecnimede

O grupo Tecnimede é uma companhia farmacêutica portuguesa que iniciou a sua atividade em 1980 e cuja missão central é contribuir para o aumento da saúde e acesso aos medicamentos em todo o mundo através do seu desenvolvimento, produção, promoção e comercialização^[1,2].

Um dos focos basilares assenta nas atividades de investigação e desenvolvimento (I&D) de produtos de inovação em áreas terapêuticas de grande desafio como doenças cardiovasculares e metabólicas, doenças degenerativas do sistema nervoso central (SNC) e doenças infecciosas, mas também no desenvolvimento de medicamentos essencialmente similares (genéricos)^[3].

Prova de todo o investimento efetuado em I&D é o Labor Qualitas (LQ), sediado em Caixaria, Torres Vedras, onde realizei o meu estágio (Figura 2). Este é um *campus* de I&D no qual se concentram atividades no âmbito do desenvolvimento químico farmacêutico (analítico e galénico), ensaios laboratoriais para análise de matérias primas e produto acabado, ensaios de estabilidade, bem como validação de equipamentos e processos.

O LQ apresenta uma estrutura orgânica organizada em diversos departamentos (Figura 1), sendo eles:

- Departamento de Química Fina (DQF) que se encarrega da investigação na área de síntese química;
- Laboratório de Ensaios (LE) que se subdivide no Laboratório de Química Analítica e no Laboratório de Microbiologia, tendo como principais funções a execução de análises físico-químicas e ensaios de estabilidade e execução de análises microbiológicas, respetivamente;
- Desenvolvimento Farmacêutico (DF) que tem por base o desenvolvimento de formas farmacêuticas, incluindo quer o desenvolvimento analítico quer o galénico;
- Departamento de Cultura de Células (DCC) responsável pela realização de estudos in vitro em base celular.

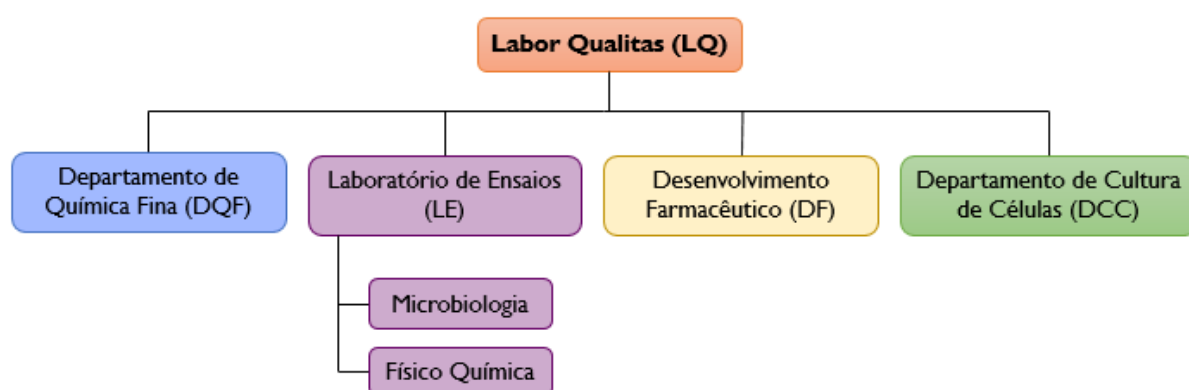


Figura 1. Organograma representativo da estrutura orgânica do LQ.

O meu estágio decorreu no departamento de DF, onde fui integrada numa das equipas e acompanhei e participei no desenvolvimento dos respetivos projetos.

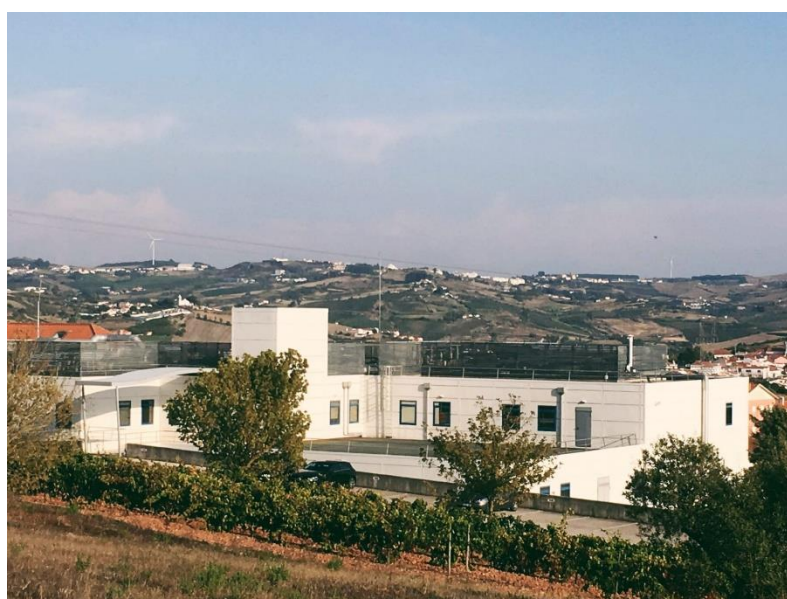


Figura 2. Fotografia do exterior do Labor Qualitas – Grupo Tecnimede.

3. Análise SWOT



Figura 3. Representação esquemática da análise SWOT referente ao estágio curricular realizado no Grupo Tecnimede.

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Integração e acompanhamento

O estágio teve início na sede do Grupo Tecnimede, na Abrunheira, onde tive oportunidade de conhecer a sua história e as instalações, nomeadamente o edifício de produção, a Atlantic Pharma. No dia seguinte, uma vez chegada ao LQ, foi feita uma apresentação com a contextualização de cada departamento, bem como alguns conceitos basilares essenciais para uma melhor compreensão das tarefas que viria a desempenhar. Posto isto, fui integrada e acolhida numa equipa de trabalho liderada pela Doutora Paula Relógio.

Desde o primeiro dia, foi notório o interesse de todos os elementos do LQ em esclarecer qualquer dúvida que fosse surgindo, o que tornou muito fácil a minha adaptação às rotinas do laboratório. O LQ dispõe de uma equipa pluridisciplinar composta por profissionais de diversas áreas, entre eles farmacêuticos, químicos, bioquímicos, biólogos e engenheiros, o que me permitiu interligar conhecimentos e partilhar opiniões, sentindo-me parte integrante da equipa.

3.1.2. Diversidade de tarefas desempenhadas

Foram vários os projetos que tive oportunidade de integrar ao longo destes três meses de aprendizagem, destacando-se o projeto relativo a um liofilizado, onde me foi dada a possibilidade de auxiliar na validação do processo de fabrico (VPF) após *scale-up*, através da realização de um estudo de *holding time* segundo um protocolo de validação no qual consta a descrição dos testes a realizar, bem como os respetivos critérios de aceitação.

A VPF é definida como uma evidência documentada de que o processo de fabrico pode ser realizado, de acordo com parâmetros estabelecidos, de forma eficaz e reprodutível, satisfazendo as especificações e características de qualidade estabelecidas *a priori*. Adicionalmente, esta etapa permite, através de uma visão detalhada dos procedimentos, prever e/ou confirmar a existência de parâmetros críticos de processo detetados no decorrer do desenvolvimento do projeto, passíveis de serem monitorizados durante a validação^[4].

A produção de um liofilizado assenta em cinco etapas fundamentais esquematizadas na figura 4:

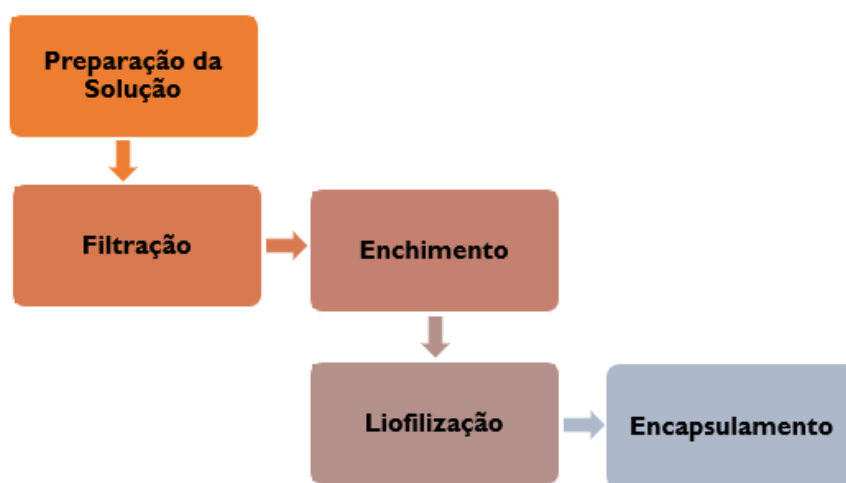


Figura 4. Representação esquemática do processo de fabrico de um liofilizado.

As análises físico-químicas realizadas no estudo de *holding time*, tiveram por base três fases do processo de fabrico: 'Solução Bulk', 'Enchimento assético' e 'Encapsulamento'. Para os dois primeiros, os parâmetros analisados foram a aparência da solução, pH, densidade, doseamento e compostos relacionados. Por sua vez, após a fase de encapsulamento, analisou-se o aspeto do *cake*, o teor em água (pela técnica de Karl-Fisher), doseamento e compostos relacionados. A análise do doseamento e compostos relacionados (impurezas) é efetuada recorrendo à técnica de HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*), à qual estão inerentes algumas tarefas que tive oportunidade de desempenhar, nomeadamente a preparação das soluções padrão, soluções amostra, fases móveis e soluções de lavagem.

Paralelamente ao estudo de *holding time*, foi-me permitida a realização da Análise de Produto Acabado (APA) que incluiu, para além de todos os ensaios descritos anteriormente, a determinação do tempo de reconstituição, uniformidade de massa, contaminação por partículas visíveis e subvisíveis, pureza estereoquímica (por HPLC), osmolalidade e limpidez e grau de opalescência. Adicionalmente, participei ainda no desenvolvimento de estudos de estabilidade, após reconstituição e com contentor aberto, e um estudo de compatibilidade entre o liofilizado em análise e outras soluções de reconstituição.

Por fim, contactei também com outros projetos, nos quais efetuei, por exemplo, ensaios de desagregação e de dissolução de comprimidos. Este último, é um ensaio que tem como objetivo estudar o comportamento do fármaco *in vitro*, em condições o mais semelhantes possíveis às fisiológicas, tentando antecipar o seu comportamento *in vivo* a partir dos perfis de dissolução obtidos.

Esta pluralidade de tarefas foi reflexo da qualidade e versatilidade desta experiência, através da qual adquiri um vasto leque de competências, entre as quais autonomia e o maior domínio das técnicas laboratoriais descritas.

3.1.3. Rigor no cumprimento das regras laboratoriais

A indústria farmacêutica é uma das áreas mais regulamentadas do mercado e, como tal, no Grupo Tecnimede, o trabalho laboratorial exige o cumprimento de inúmeras regras e protocolos. Começando pelos equipamentos, estes são alvo de registo da sua utilização em plataforma própria, recorrendo ao número interno através do qual se encontram identificados. Esta metodologia torna-se essencial para agilizar e organizar o trabalho diário, bem como para garantir uma maior rastreabilidade das suas utilizações, o que poderá ser importante na

identificação e correção de eventuais falhas. A par dos equipamentos, através da mesma plataforma, também as substâncias e reagentes são alvo de registo aquando da saída do armazém. Neste caso, o registo é efetuado com recurso a um código interno e identificação das respetivas datas de abertura e de validade do produto em causa. A criação desta base de dados permite, não só uma eficaz gestão do *stock* de materiais, como também a consulta da frequência de utilização de cada um dos equipamentos existentes no laboratório.

Destaca-se também o rigor na elaboração dos cadernos de laboratório, onde se efetuam anotações diárias e detalhadas de todos os ensaios realizados, registando-se o devido procedimento experimental, os reagentes utilizados (com o código interno e respetiva data de validade), bem como os instrumentos de medição e os registos impressos das pesagens com a identificação da balança usada, data e hora do respetivo processo.

Ao mencionado anteriormente, acrescem todas as regras básicas de segurança inerentes ao trabalho de laboratório, tais como o uso de óculos e máscara de proteção.

Este foi, sem dúvida, um ponto forte do meu estágio na medida em que, graças ao contacto com todas estas dinâmicas, esta experiência se revelou extremamente proveitosa e capaz de me proporcionar uma visão realista das exigências da indústria farmacêutica.

3.1.4. Aplicação dos conhecimentos adquiridos ao longo do MICF

O plano de estudos do MICF comporta uma formação ampla e diversificada em áreas distintas, capaz de permitir aos seus alunos uma diferenciadora preparação para o futuro profissional. Neste estágio, tive oportunidade de aplicar e integrar os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos no decorrer do percurso académico, salientando-se unidades curriculares como Tecnologia Farmacêutica, Métodos Instrumentais de Análise e Assuntos Regulamentares.

Apesar da excelente capacidade de resposta que o MICF oferece perante a complexidade da cadeia de valor do medicamento, este é um processo de aprendizagem contínuo que justifica a importância do estágio curricular, pois permitiu aprofundar conceitos previamente adquiridos, mas, acima de tudo, assimilar novas ferramentas e conhecimentos.

3.1.5. Gestão de tempo

Ao longo destes três meses de estágio, foram várias as *softskills* que aprimorei, entre as quais a gestão de tempo. Com o decorrer do tempo, fui adquirindo cada vez mais autonomia e, paralelamente, o número de tarefas propostas também foi aumentando.

Deste modo, tendo em conta a diversidade de tarefas, surgiu a necessidade de efetuar o planeamento das mesmas, estabelecendo prioridades e identificando os principais objetivos a cumprir. A capacidade de organização teve, assim, uma fulcral importância e um impacto positivo no decorrer do trabalho, maximizando a produtividade e rentabilizando o tempo.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Duração do estágio

A complexidade e diversidade das metodologias e tarefas desempenhadas no departamento de DF aliadas à demora no *time-to-market* fazem com que seja necessário um longo período de aprendizagem no sentido de permitir um acompanhamento integral do processo. Por exemplo, ainda que me fosse permitido auxiliar na VPF de um lote industrial, não tive possibilidade de acompanhar todo o processo prévio de desenvolvimento galénico, pois torna-se impossível dada a extensão temporal deste tipo de projetos.

Para além disso, considero que os três meses de duração do estágio foram um período muito escasso para ganhar completa autonomia nas técnicas laboratoriais, bem como consolidar os conhecimentos transmitidos no contexto de indústria farmacêutica, o que me leva a considerar este ponto como um aspeto menos positivo do estágio.

3.2.2. Falta de contacto com outros departamentos

Ter uma visão global da forma como os diferentes departamentos estão interligados e interagem entre si em torno de um objetivo comum é algo que considero importante e, como tal, gostaria de ter tido possibilidade de contactar com outros departamentos do LQ, tais como o DCC e o Laboratório de Microbiologia. Este seria um aspeto positivo no enriquecimento desta experiência uma vez que me seria transmitida uma noção mais geral e integrada do papel do LQ no seio do Grupo Tecnimede.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Contacto com diversos equipamentos laboratoriais

A diversidade de tarefas desempenhadas a nível laboratorial permitiu um contacto alargado com diversos equipamentos. Para além de aperfeiçoar as técnicas de utilização de equipamentos com os quais já havia trabalhado anteriormente, tais como equipamentos de

dissolução, de desagregação, potenciómetro e Karl-Fisher, tive também a possibilidade de utilizar novos equipamentos, bem como aprender as técnicas relativas ao uso dos mesmos.

Destaca-se o uso frequente do HPLC que, embora já tivesse alguma formação de base graças aos conceitos abordados ao longo do MICF, me dotou de novos conceitos e, simultaneamente, maior autonomia na execução desta técnica.

3.3.2. Formação interna contínua

A primeira semana de estágio destinou-se à formação em sala, nomeadamente através da leitura de normas internas, entre as quais Instruções Específicas de Trabalho (IET) e Instruções Gerais da Qualidade (IGQ). As IET englobam vários capítulos entre os quais: Técnicas (TEC), Operações, Equipamentos e Processos (OEP) e Qualidade (QUA).

Posteriormente, à medida que ia realizando um ensaio ou utilizando um equipamento novo, foi-me sendo fornecida alguma formação prática na qual, após visualizar o procedimento, me era dada autonomia para a repetição do mesmo, ainda que sob supervisão, numa primeira fase. Adicionalmente, tive também oportunidade de participar nas formações de âmbito geral relativas à adoção de novas técnicas e/ou manuseamento de novos equipamentos.

É de salientar, ainda, as várias informações que me foram transmitidas pela experiência dos profissionais, cuja disponibilidade, simpatia e recetividade gostaria de enaltecer.

3.4. Ameaças

3.4.1. Deadlines estreitos

Pelo facto de os medicamentos de referência (MR) beneficiarem de proteção de propriedade intelectual, assegurada por patente durante 20 anos, e simultaneamente de exclusividade dados e de proteção de mercado sendo 8 anos em regime de exclusividade de dados, acrescidos de mais 2 anos em exclusividade de mercado, faz com que o desenvolvimento de um medicamento genérico (MG) seja paralelo a um aumento da pressão competitiva uma vez que, após término da patente, todo o tempo se torna escasso para o desenvolvimento do MG, assente em três pilares: qualidade, segurança e eficácia.

Todos estes fatores, juntamente com o elevado grau de regulamentação do setor constituem uma ameaça para a atividade da indústria farmacêutica e fazem com que o farmacêutico sinta uma crescente necessidade de ser resiliente e proativo de modo a ultrapassar estes desafios.

É, portanto, imprescindível que, enquanto profissionais, sejam desenvolvidas capacidades de responder eficientemente aos problemas que se colocam.

3.4.2. O custo da inovação

A I&D é uma das áreas da indústria farmacêutica onde é feito um maior investimento. Embora a aposta nesta área permita às indústrias potenciar o seu crescimento, esta é uma atividade bastante morosa e exigente e, como tal, é vital que se tenha em mente o objetivo central deste processo: um produto de qualidade, que seja industrializável e competitivo.

Para além do investimento financeiro, também a dimensão temporal verificada até que se alcance o objetivo é uma das características da busca pela inovação. O tempo que se investe diariamente nas várias atividades sem que se saiba, muitas vezes, o sucesso que virá (ou não) a ser alcançado são ameaças próprias da investigação, notórias no decorrer do estágio.

4. Conclusão

Embora de limitada duração, esta experiência revelou-se extremamente dinâmica e gratificante, não só a nível profissional, uma vez que tive o primeiro contacto com a indústria farmacêutica, o que me permitiu perceber o funcionamento de uma nova realidade, mas também a nível pessoal, na medida em que assimilei novas competências que me irão tornar, certamente, uma melhor farmacêutica.

Termino esta jornada, com a convicção de que se confirma a paixão pela indústria, nomeadamente na área de I&D, onde diariamente estamos confrontados com novos e exigentes obstáculos, perante os quais somos chamados a refletir e a tomar decisões.

Por fim, um agradecimento ao Grupo Tecnimede pela oportunidade de estágio, bem como a todos os profissionais que me acolheram, pois transmitiram-me uma noção mais abrangente da indústria farmacêutica e expandiram os meus horizontes com uma nova visão acerca do campo de ação do farmacêutico.

5. Referências Bibliográficas

- 1- GRUPO TECNIMEDE – **Sobre**. [Acedido a 23 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.tecnimede.com/pt/grupo-tecnimede/sobre>
- 2- GRUPO TECNIMEDE – **Missão e Valores**. [Acedido a 23 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.tecnimede.com/pt/grupo-tecnimede/missao-e-valores>
- 3- GRUPO TECNIMEDE – **I&D**. [Acedido a 23 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.tecnimede.com/pt/i-d>
- 4- EUROPEAN MEDICINES AGENCY – **Guideline on process validation for finished products** - information and data to be provided in regulatory submissions. [Acedido a 9 de julho de 2019]. Disponível na Internet: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-process-validation-finished-products-information-data-be-provided-regulatory-submissions_en.pdf

CAPÍTULO III

Monografía

“Neuro- and chronobiology of depression coupled to genetic polymorphisms of enzymes determine disease evolution and drug resistance?”

List of Abbreviations

3-HK	3-hydroxykynurenine
5-HT	Serotonin
5-HTTLPR	Serotonin-linked polymorphic region
ABC	ATP-Binding Cassette
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone
AD	Antidepressant Drugs
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BBB	Blood-Brain Barrier
BD	Bipolar Disorder
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMALI	Brain muscle ARNT-like protein I
CBT	Core Body Temperature
CK	Casein Kinase
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CNS	Central Nervous System
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRF	Corticotropin-releasing factor
Cry	Cryptochrome
CYP450	Cytochrome P450
DA	Dopamine
DLMO	Dim Light Melatonin Onset
DMEs	Drug metabolising enzymes
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5 th edition)
EEG	Electroencephalogram
GR	Glucocorticoid receptor
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IL-1β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
LPS	Lipopolysaccharide
MAO	Monoamine oxidase
MAOi	Monoamine Oxidase inhibitor
MAPKs	Mitogen-activated protein kinase
MDD	Major Depressive Disorder
MDRI	Multidrug resistance protein I
mGluR	Metabotropic Glutamate Receptor
NE	Norepinephrine
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NPAS2	Neuronal Pas domain protein

NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OATPs	Organic Anion Transporting Polypeptides
PAD	Phase Angle Difference
PDD	Persistent Depressive Disorder
<i>Per</i>	Period
P-gp	P-glycoprotein
QUIN	Quinolinic acid
REM	Rapid Eye Movement
Roraα	Retinoic acid-related orphan receptor alpha
SAD	Seasonal Affective Disorder
SCN	Suprachiasmatic nucleus
SLC	Solute Carrier
SLC6A4	Solute carrier family 6 member 4 gene
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNRI	Serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors
SSRIs	Serotonin reuptake inhibitors
SWS	Slow Wave Sleep
TCA	Tricyclic antidepressant
TNF-α	Tumor necrosis factor- α
TRD	Treatment-resistant depression
UPP	Ubiquitin Proteasome Pathway
WHO	World Health Organization

Resumo

A depressão é a principal causa de incapacidade, afetando mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar do seu crescente impacto na saúde global, indivíduos com depressão apresentam, frequentemente, resistência aos tratamentos farmacológicos disponíveis, denominada de depressão resistente ao tratamento. Deste modo, uma das prioridades ao nível da saúde pública contempla a tentativa de aumentar os níveis de remissão. Neste contexto, o principal objetivo desta monografia consiste em explicar a fisiopatologia da depressão relacionando-a com as teorias cronobiológicas e polimorfismos genéticos de enzimas enquanto fatores determinantes para a evolução da doença e resistência aos fármacos. Paralelamente, a análise das terapias farmacológicas e não farmacológicas, bem como das perspectivas futuras, é também objetivo desta revisão.

A exposição ao stress é conhecida como sendo a maior causa do desenvolvimento de depressão, uma vez que leva à disfunção da plasticidade neuronal e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Adicionalmente, os mecanismos imunológicos encontram-se também alterados em pacientes com depressão, sendo responsáveis pela sobreexpressão de citocinas.

Estudos demonstraram que alterações no marcapasso circadiano mestre, localizado no núcleo supraquiasmático, desregulam a função circadiana em doentes deprimidos. Para além disso, alterações da fase REM (do inglês, *rapid eye movement*) do sono, da temperatura corporal, da secreção de hormonas e mecanismos genéticos são frequentemente relacionados com episódios depressivos.

Evidências científicas recentes salientam que polimorfismos genéticos associados a enzimas metabólicas e alterações na expressão e/ou atividade de transportadores de efluxo podem prever a resposta aos fármacos antidepressivos. Uma vez que, de pessoa para pessoa, existe uma significativa variabilidade de respostas, vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de controlar (não evitar) esta problemática através da individualização da terapêutica. O recurso a biomarcadores genéticos, a par da descoberta de novos fármacos, são essenciais para a evolução do tratamento da depressão, sendo o seu sucesso baseado na medicina personalizada.

Palavras-chave: depressão; depressão resistente ao tratamento; polimorfismos de nucleótido único; ritmo circadiano; transportadores ABC; biomarcadores da depressão.

Abstract

Depression is the main cause of disability, affecting more than 300 million people worldwide. Despite this growing impact on world health, depressed people are often resistant to the the marketed pharmacologic treatments; this condition is named treatment-resistant depression. Therefore, to increase its remission levels is today a public health priority. In this context, the main goal of this review is to explain the pathophysiology of depression, relating it with the chronobiologic and genetic factors that may determine the disease evolution and drug resistance. In parallel, the current pharmacological and non-pharmacological therapies and future perspectives will be also herein reviewed.

Stress exposure is ascribed as a major cause of depression development, as it leads to neuronal plasticity and hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction. Additionally, dysfunctional immunological mechanisms are also observed in depressed patients, particularly the overexpression of cytokines.

Some studies demonstrate that alterations in the master circadian pacemaker located in suprachiasmatic nucleus dysregulate the circadian function in depressed patients. Furthermore, alterations in rapid eye movement sleep, core body temperature, hormones secretion and genetic mechanisms are frequently related to depressive episodes.

Genetic polymorphisms coupled to enzymes and alterations of the expression and/or activity of efflux transporters can predict the response to antidepressant drugs. Due to the high inter-individual variability observed in depressed patients, several studies have been conducted to monitor (but not avoid) this problem, applying a personalized pharmacotherapy. The use of genetic biomarkers, as well as the discovery of new drugs, are essential for the evolution of the treatment of depression being its success based on personalised medicine.

Keywords: depression; treatment-resistant depression; single nucleotide polymorphisms; circadian rhythm; ABC transporters; biomarkers of depression.

1. Introduction

In accordance to the World Health Organization (WHO), depression is a common mental disorder that affects more than 300 million people around the world. This is a limiting pathology that substantially decreases patients' life quality (WHO, 2018).

There are different types of depressive disorders that may vary in etiology, duration, symptoms and treatment. This review addresses with greater emphasis on the major depressive disorder (MDD), bipolar disorder (BD), seasonal affective disorder (SAD) and treatment-resistant depression (TRD). The diagnostic criteria are established in the fifth revision of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), which is the predominant classificatory system, and was published in 2013 by the American Psychiatric Association (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - DSM-V, 2013).

Different neurobiological mechanisms might underlie depression, including monoamine neurotransmitters, neurogenesis and neuroplasticity as well as inflammation and circadian rhythm (SHADRINA *et al.*, 2018). In mammals, circadian rhythms oscillate with a period of approximately 24-hours under the regulation of a central pacemaker that is located in the suprachiasmatic nucleus (SCN). Circadian cycle deregulation, caused by changes in the genetic functioning of the brain and sleep disruption has been described in depression (VARINTHRA and LIU, 2019). Alterations in efflux transporters expression and/or activity have also been related with depression etiology and predict the response to antidepressant drugs (ADs) since some of them are substrates for these transporters (BRÜCKL and UHR, 2016).

ADs are the preferred pharmacological group for the treatment of depression. However, it is known that approximately 50% of patients with depression do not respond adequately to conventional therapies (SINGH, 2015). Drug resistance is the most relevant problem in the treatment of depression being this situation probably a consequence of the biological and environmental heterogeneity of depression, suggesting that is important to identify biomarkers of antidepressant response which would be useful to develop novel therapies and to provide personalised antidepressant treatments (FABBRI *et al.*, 2019). Thus, research for new advances in pharmacological and non-pharmacological treatments remains required. Given the genetic and physiological variety of depressed people, it is expected that antidepressant therapy will be increasingly personalised and individually tailored.

In this context, the present review intends to contribute to the understanding of the pathophysiology of depression, presenting a set of evidences that support its relationship with

circadian rhythm as well as genetic polymorphisms of enzymes that predict the response to antidepressant treatment. Since ageing is related to several brain changes and has been associated to a decrease of the activity of SCN cells as well as to a disruption in the circadian rhythm activity, this review also exploits the triad depression-elderly-circadian (COSTA *et al.*, 2013).

2. Depression and common types of depression

2.1. Major Depressive Disorder (MDD)

According to DSM-5, MDD, also named unipolar depression since it presents single or recurrent episodes, is the most common form of depression. MDD is characterised by five or more of the following symptoms nearly every day for longer than two weeks. These symptoms are: depressed mood, anhedonia, feelings of worthlessness or excessive guilt, suicidal ideation, plan or attempt, fatigue or loss of energy, insomnia or hypersomnia, significant weight or appetite gain or loss, diminished ability to think or concentrate, or indecisiveness and psychomotor agitation or retardation (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - DSM-V, 2013).

It is notorious that not all the symptoms presented are exclusive to depression. While symptoms like anhedonia are more specific to a depressive disorder, other symptoms frequently appear in other medical illnesses, such as fatigue, loss of appetite or weight, and insomnia, which are, hence, unspecific (MALHI and MANN, 2018).

2.2. Seasonal Affective Disorder (SAD)

SAD is considered a subtype of MDD; it is a mood disorder that has a seasonal pattern characterised by recurrence of depressive episodes in winter when the days are shorter and there is less sunlight. The cause of this disorder remains unknown, but it is thought to be related not only to variation in light exposure in different seasons but also to neurotransmitter and circadian rhythm dysfunctions (KURLANSIK and IBAY, 2012).

The diagnosis is made if, over two years, at least two major depressive episodes occurred in winter. Subjects with SAD tend to experience criteria not considered to be specific for other depressive disorder, such as a lack of energy, oversleep, overeat and carbohydrate craving with subsequent weight gain (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - DSM-V, 2013). A

daily dose of light therapy in the early morning is typically used in SAD treatment (KURLANSIK and IBAY, 2012).

2.3. Bipolar disorder (BD)

BD is characterised by a recurrent manic (BD 1) or hypomanic (BD 2) and depressive episodes alternated with periods of normal mood. According to DSM-5, major depressive disorders are separated from BDs because manic symptoms only occur in BDs (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - DSM-V, 2013). These manic episodes involve cognitive, physical and behavioural symptoms such as inflated self-esteem, distractibility, over-activity, more talkative than usual and decreased need for sleep. Sometimes people experience even psychosis episodes. An accurate diagnosis of BD is a lengthy process because many times, symptoms are confused with other disorders like schizophrenia. A stressful and conflictual environment and social factors may be at the origin of the BD episodes (ANDERSON *et al.*, 2012).

2.4. Persistent Depressive Disorder (PDD)

Dysthymic disorder is a chronic mental disorder similar to MDD. Nevertheless, its symptoms are less severe but last longer. DSM-5 criteria to PDD diagnosis are the presence of two or more of the following symptoms for most of the day during at least two years: poor appetite or overeating, insomnia or hypersomnia, low energy or fatigue; low self-esteem; poor concentration or difficulty making decisions; and feelings of hopelessness. Therefore, social and cognitive symptoms are more common (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION - DSM-V, 2013).

Older adults frequently present a late age of onset, without a history of other mood disorders. Psychosocial factors like stress and unfavourable social circumstances, including lack of support, isolation, and bereavement may contribute to PDD in the elderly (DEVANAND, 2014).

2.5. Treatment-resistant depression (TRD)

Depressive treatment is conventionally based in two fields – psychological and pharmacological treatments – being their combination recommended because associated treatment is better than either evidence alone (PARIKH *et al.*, 2016).

Cognitive-behavioural therapy is the first-line recommendation for acute and maintenance MDD psychological treatment. Focused on the symptoms, cognitive-behavioural therapy is an intensive psychological treatment aimed at increasing the participation in activities that improve patient's mood, by promoting a sense of achievement (PARIKH *et al.*, 2016).

Although psychological treatments are the first-line recommendation in low-risk cases of depression, in some situations, pharmacological treatment can be considered, namely when nonpharmacological interventions are not enough (KENNEDY *et al.*, 2016). The first-line recommendation for conventional pharmacological therapy of depression is based on selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) such as citalopram, escitalopram, fluoxetine, paroxetine and sertraline. Serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors (SNRI), like duloxetine and venlafaxine, are also an example of ADs first-line recommended, as well as agomelatine, a melatonergic receptor (MT₁ and MT₂) agonist and serotonin (5-HT) antagonist (KENNEDY *et al.*, 2016). The mechanism of action of most of the ADs is based on the neurotransmission of monoamines, 5-HT, norepinephrine (NE) and/or dopamine (DA).

However, an estimated fewer than 50% of all patients with depression show full remission with optimised treatment, i.e. a significant percentage of depressive patients exhibit resistance to all available standard treatments developing TRD (SINGH, 2015, VANCOVA *et al.*, 2018). This way, given its high prevalence, TRD is considered a type of depression, being the main causes and control strategies addressed below.

3. Neurobiology of depression

3.1. Dysfunction of monoamine neurotransmission

The monoamine hypothesis is the major theory underlying the pathophysiology of depression and indicates that it is unleashed by functional depletion of monoamines levels in some structures of the central nervous system (CNS), notably 5-HT, NE and DA. This theory was supported on the successful serendipitous discovery of the mechanism of action of two antidepressants: iproniazid, an irreversible and nonselective monoamine oxidase inhibitor (MAOi), and imipramine, a tricyclic antidepressant (TCA) that inhibits reuptake of monoamine neuromediators, both responsible for increasing monoamine transmission in synaptic cleft (DEAN and KESHAVAN, 2017, MULINARI, 2012, SHADRINA *et al.*, 2018).

Genetic polymorphisms regarding neurotransmission targets have been related to depression. The solute carrier family 6 member 4 gene (*SLC6A4*) encodes the transporter that is

responsible for the reuptake of 5-HT from the synaptic cleft to be recycled or broken down by monoamine oxidase A (MAO-A) and is recognized as one of the best candidate genes involved in depression (AAN HET ROT *et al.*, 2009, SHADRINA *et al.*, 2018). It appears that serotonin-linked polymorphic region (5-HTTLPR) localised in the promoter region of *SLC6A4* prevents maintenance 5-HT levels in the presynaptic region and is related with an increased risk of depression (DEAN and KESHAVAN, 2017, SHADRINA *et al.*, 2018). However, some meta-analyses showed that only the short allele (S allele) of the 5-HTTLPR had reduced 5-HT transporter expression in some depression types (JIANG *et al.*, 2013, KAUTTO *et al.*, 2015).

Although this theory is one of the most consensual, several reviews have shown a clinical delayed onset (about 2 or 3 weeks) of antidepressants efficacy, suggesting that the decrease in the monoamine level may not be related to depression pathophysiology, but may be the result of neural dysfunction. Therefore, the monoamine receptor hypothesis was proposed considering the autoreceptor a key of antidepressant efficacy (FEKADU *et al.*, 2017, LIU, B. *et al.*, 2017a). Nevertheless, the monoamine theory is still the most prevailing hypothesis of depression and the currently used antidepressants have the monoamine transporters and receptors as target (LIU, B. *et al.*, 2017a).

3.2. Neurotrophic hypothesis: neurogenesis and neuroplasticity disturbance

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a protein member of the neurotrophin family abundantly expressed in the brain's limbic structures; it is known to be critically involved in growth, differentiation, plasticity and apoptosis of the neurons making the brain able to adapt to various stimulus. The neuroplasticity theory of depression bases on the decrease of growth factors expression, such as BDNF, and atrophy of limbic structures. Patients with depression exhibit reduced BDNF blood levels as well as in the structures implicated in depression, such as the hippocampus and prefrontal cortex, inducing cellular atrophy and loss of glia (LIU, B. *et al.*, 2017a, SHADRINA *et al.*, 2018).

But what is the main cause? Indeed, it has been demonstrated that the acute and chronic unpredictable stress exposure and genetic predisposition are both responsible for decreasing endogenous neurotrophin levels with consequent alteration of neuronal plasticity. Some studies have reported that stress leads to a reduction in spine number and density, decreases the dendritic length and increases cell vulnerability in the hippocampus and prefrontal cortex neurons in depressed patients (DUMAN *et al.*, 2016).

The Val66Met polymorphism in *BDNF*, which results in an amino acid substitution of valine (Val) to methionine (Met) at codon 66, has been frequently associated with changes in BDNF secretion and pathophysiology of depression. Nevertheless, this evidence is inconsistent and differ according to factors like sex and age. So, further research is required to provide evidence between this *BDNF* polymorphism and risk of depression (SHADRINA *et al.*, 2018, TSAI, 2018).

Typical antidepressants, like SSRIs, have shown efficacy in increasing BDNF expression and synaptic plasticity, allowing atrophy reversion and keeping synaptic connections and cell survival. Nevertheless, they have delayed onset of efficacy (DEAN and KESHAVAN, 2017, DUMAN *et al.*, 2016).

Ketamine, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, is an antidepressant agent that, despite some side effects, produces a rapid response (within hours) reversing BDNF deficits caused by chronic stress and depression (DUMAN, 2018, GERHARD and DUMAN, 2018, LENER *et al.*, 2017, LIU, B. *et al.*, 2017a, SATTAR *et al.*, 2018). Physical activity associated with caloric restriction has also been reported as responsible to optimise BDNF levels and increase synaptogenesis in depressed people (PHILLIPS, 2017).

3.3. Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysfunction

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is the central system for the response to stress. When activated by external stimuli, such as stress, parvocellular neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus are stimulated by corticotropin-releasing factor (CRF), which in turn is transported to the anterior pituitary gland leading to adrenocorticotropic hormone (ACTH) secretion. ACTH is released into the blood circulation and exerts its action at the level of adrenal cortex that synthesises and consequently secretes glucocorticoids, particularly cortisol, which is a steroid hormone, known as a stress hormone. In peripheral tissues, cortisol binds to high affinity mineralocorticoid receptors (MRs, type I) and low affinity glucocorticoid receptors (GRs, type II) (ARNETT *et al.*, 2016, SHADRINA *et al.*, 2018).

In normal situations, negative feedback occurs with cortisol increasing, i.e. cortisol acts on the hypothalamus, over GRs, inhibiting HPA axis and consequently the cortisol levels decline. However, in major depression patients it was found reduction of GRs sensibility and negative feedback mechanisms disruption with hyperactivity of HPA axis and consequent increase of production and secretion of glucocorticoids (hypercortisolemia) in various cerebral regions.

High levels of glucocorticoids have shown harmful effects in depressed patients, including decreased number of synaptics and atrophy of multiple brain structures, namely amygdala, hippocampus and medial prefrontal cortex. In conclusion, HPA axis dysfunction has a prominent role in depression pathophysiology (DEAN and KESHAVAN, 2017, DUMAN *et al.*, 2016, FEKADU *et al.*, 2017, SHADRINA *et al.*, 2018).

3.4. Immuno-inflammation

The immunological mechanisms of the organism play a critical role not only concerning body protection but also to the homeostasis maintenance. Currently, a strong relation is evident between the CNS function and activation of the innate immune response. Several meta-analyses suggest an increased plasma and/or cerebrospinal fluid levels of immunologic parameters in depressed patients, namely pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor- α (TNF- α), acute phase proteins such as C-reactive protein, haptoglobin and neopterin, chemokines and cellular adhesion molecules (DOWLATI *et al.*, 2010, EYRE *et al.*, 2016, KOHLER *et al.*, 2017, ZHANG, J. *et al.*, 2016a). A significant relationship between inflammatory markers and antidepressant treatment resistance has also been documented in a recent study. Accordingly, higher plasma concentrations of TNF, soluble TNF receptor 2 and IL-6 in patients with a history of multiple failed treatment trials, an indicator of treatment non-response (HAROON *et al.*, 2018).

Besides, treatment of patients with pro-inflammatory cytokines or endotoxin lipopolysaccharide (LPS) induces a syndrome named “sickness behaviour” which resembles symptoms MDD including fatigue, anhedonia, anorexia, sleep disturbance and reduced locomotor activity (DANTZER, 2017, LEONARD, 2018).

Although the mechanism responsible for the association between depression and increased production of cytokines is not completely clear, it is well-known that stress (psychological, environmental, or physiological) can effectively initiate an inflammatory response system. Usually, under stress conditions, the sympathetic nervous system and the HPA axis are activated and response in a physiological way, having an immunosuppressant and anti-inflammatory action (LIU, Y. Z. *et al.*, 2017b). However, when stress stimuli are prolonged or over-exaggerated can lead to activation of the HPA axis that is exacerbated and become immune cells less sensitive to the anti-inflammatory effects, i.e. glucocorticoid desensitisation and resistance (CALCIA *et al.*, 2016, SLAVICH and IRWIN, 2014).

The peripherally released cytokines can cross the Blood-Brain Barrier (BBB) and trigger a central inflammation in the brain, namely neuroinflammation. Cytokines cross BBB via multiple pathways including the interaction with barrier cells and binding with their specific transporters which are expressed in brain endothelium, through macrophage-like cells located in the circumventricular organs and choroid plexus and stimulation of vagal afferent fibers which allow a neuroimmune communication (BANKS, 2005, CATTANEO *et al.*, 2015, RAISON *et al.*, 2006).

In the brain, the aforementioned cytokines affect neuronal function and activate the innate cells (microglia and astrocytes) to liberate more cytokines and chemokines in response to the inflammatory stimulus. Furthermore, the inflammatory signals are amplified because microglia cells also produce cytokines receptors and recruit the peripheral monocytes (CATTANEO *et al.*, 2015, RAISON *et al.*, 2006, WOHLEB and DELPECH, 2017).

This proinflammatory cytokines over-stimulation can lead to:

- i. Hyperactivity of the HPA axis. As described in topic 3.3., abnormal HPA axis function is one of the most change reported in MDD. Inflammation and increased cytokine levels result in weakening negative feedback due to reduced expression, sensitivity and activity of GRs through the signalling molecules. Mitogen-activated protein kinase (MAPKs), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) are some examples of these molecules. Suppression of GRs translocation from the cytoplasm to the nucleus and modulation of its phosphorylation status are examples of mechanisms that influence glucocorticoids low-responsiveness and lead to hypercortisolemia, as observed in depressed patients (Figure 1) (ADZIC *et al.*, 2018, LIU, Y. Z. *et al.*, 2017b).

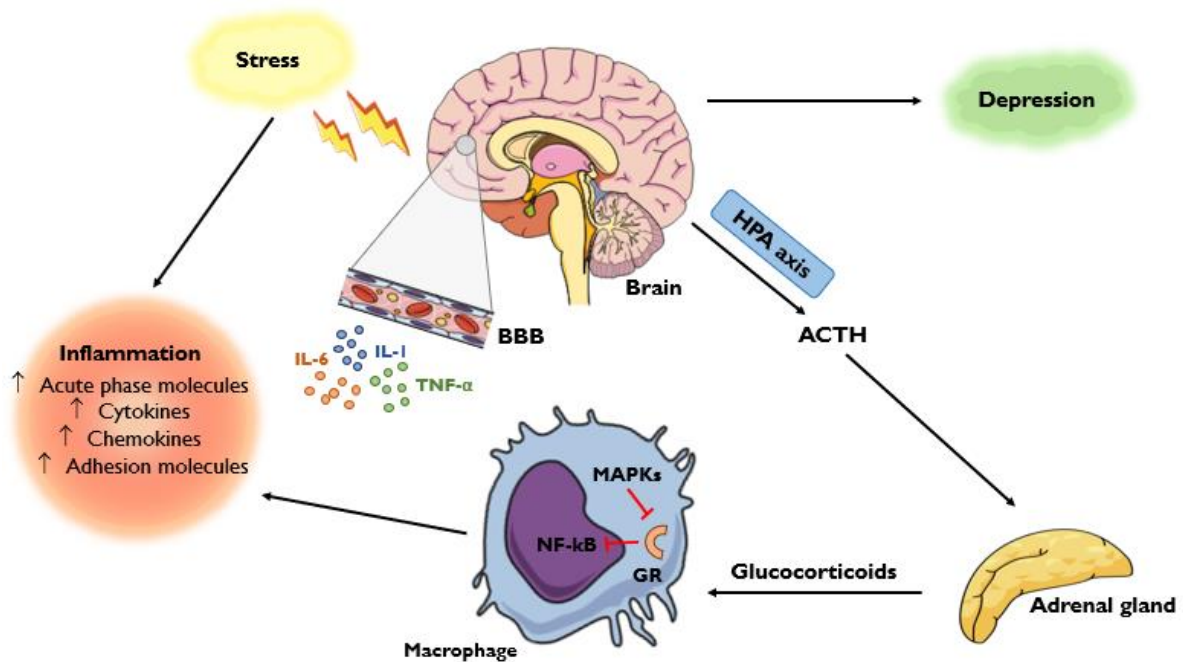


Figure 1. Schematic representation of stress system activation and inflammatory response as factors involved in depression neurobiology. (adapted from LEONARD, 2018 and RAISON *et al.*, 2006).

- ii. Increase expression and activity of serotonin, dopamine and norepinephrine transporters (SERT, DAT and NET, respectively) and, consequently, enhance of neurotransmitters reuptake and decrease their extracellular concentration (ADZIC *et al.*, 2018, AMODEO *et al.*, 2017).
- iii. Activation of the tryptophan-kynurenine metabolism pathway. Under normal conditions, the tryptophan 2,3-dioxygenase enzyme is the main responsible for tryptophan metabolism in the liver. However, in stressful and inflammatory conditions, the cytokines enhance, including interferon- γ and TNF- α , leads to microglia activation inducing the expression of ubiquitous indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), an enzyme widely distributed in immune cells, lung, kidney, and the brain. IDO breaks down the tryptophan into Kynurenine that, once transported across the BBB, is metabolised into quinolinic acid (QUIN), an NMDA glutamate agonist, and 3-hydroxykynurenine (3-HK). These kynurenine metabolites should be removed by astrocytes, but cytokines also promote downregulation of astrocyte activity. Thereby, QUIN and 3-HK may lead to neurotoxicity by activation of the glutamatergic system and generate reactive oxygen species responsible to increase of brain oxidative stress that are factors of the neurodegeneration and depression (Figure 2) (CATTANEO *et al.*, 2015, DANTZER, 2017, ZHANG, J. *et al.*, 2016a).

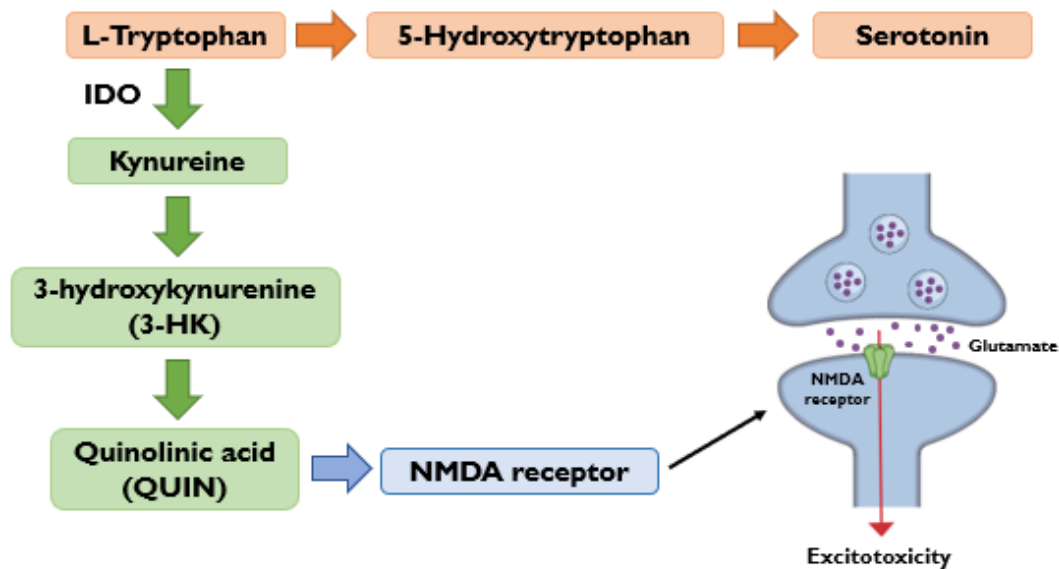


Figure 2. Tryptophan-kynurenine metabolism pathway (adapted from ZHANG *et al.*, 2016).

- iv. Abnormalities of brain serotonin. As a consequence of enhanced tryptophan metabolism via the kynurenine pathway, its bioavailability to 5-HT synthesis is decreased influencing serotonergic neurotransmission in the brain (DANTZER, 2017, ZHANG, J. *et al.*, 2016a).
- v. Increase in glutamate-induced neurotoxicity. An important function of the astrocytes is the uptake of glutamate excess from the synaptic cleft through the excitatory amino acid transporter 2 and the glutamate transporter 1, maintaining glutamate homeostasis and protecting against its toxicity in the brain. After that, glutamate is converted by astrocytes into glutamine that returns to neurons to be re-synthesized into glutamate. Activation of the inflammatory response with the release of cytokines and their signal transduction pathways, including NF- κ B can decrease excitatory amino acid transporter 2 expression compromised astrocytic glutamate uptake. Microglia and macrophages also produce reactive oxygen and nitrogen species that increase oxidative stress and lead to glutathione production whose process of synthesis through the Xc-transporter trigger glutamate release (HAROON and MILLER, 2017). Furthermore, QUIN synthesis in microglia and macrophages is responsible for blocking astrocytic glutamate reuptake and stimulate glutamate release. In short, these three mechanisms contribute to an excessive increase in extracellular glutamate and to excessive signalling through receptors for NMDA, Kainate and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA). Overstimulation of these receptors induces excitotoxicity and synaptic destruction and reduces neurotrophic factors including

BDNF, promoting the decrease in neuroplasticity and development of depressive disorders (BYLICKY *et al.*, 2018, HAROON and MILLER, 2017, LEONARD, 2018). Beyond that, the increase of NMDA activity caused by QUIN also leads to the loss of GRs. Consequently, enhance of plasma and tissue glucocorticoids block the BDNF neuronal survival and differentiation mechanisms (AMODEO *et al.*, 2017, LEONARD, 2018).

Not surprisingly, the development of other diseases characterised by the presence of inflammatory alterations including diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, asthma, cardiovascular disease and psoriasis tend to co-occur with depression, i.e. have a bidirectional relationship – inflammatory diseases leads to depression and, depression leads to inflammatory diseases (AMODEO *et al.*, 2017, SLAVICH and IRWIN, 2014). For instance, depression and diabetes mellitus have common pathophysiological pathways. Chronic stress, in addition to be a triggering factor of depression, also promotes insulin resistance and increases inflammatory cytokines that affect the functioning of the pancreatic β -cells. So, all these mechanisms underlying depression also promote the appearance of diabetes, essentially diabetes mellitus type 2 which depend on diet and lifestyle (BĂDESCU *et al.*, 2016).

Finally, in the sense of these discoveries, it is possible to suggest that the immune system can function as an indicative biomarker of CNS diseases, including depression. Furthermore, proinflammatory cytokines and their signalling pathways could be inherent processes in the physiopathology of depression. So, a new approach has emerged to its treatment. Some ADs, such as SSRIs, exhibit beneficial immunoregulatory effects, increasing anti-inflammatory cytokines and decreasing pro-inflammatory, attenuating the expression on inflammatory biomarkers. However, some meta-analysis showed that there is no consensus in relation to which cytokines and ADs may be correlated. Additionally, it's known that treatment resistance is frequent with conventional ADs. Consequently, multiple anti-inflammatory agents have been investigated as anti-cytokine strategies for therapy in depression (ADZIC *et al.*, 2018). COX-2 selective inhibitors (celecoxib) and COX non-selective inhibitors (acetylsalicylic acid and naproxene) are nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) that could exert beneficial effects on depressive symptoms. Nevertheless, in some drugs it's not possible to verify this effect in monotherapy. Anti-cytokine therapy includes monoclonal antibody (adalimumab, infliximab and tocilizumab) or cytokine inhibitor (etanercept) and has been seen as a safe and effective alternative for TRD, essentially in subgroups of patients with TRD characterised by inflammation (KAPPELMANN *et al.*, 2018).

Apart from drugs with primary anti-inflammatory effect, such as NSAIDs and cytokine inhibitors, there are also other drugs with anti-inflammatory properties. ADZIC *et al.* (2018) studied the role of statins, polyunsaturated fatty acids, thiazolidinediones, modafinils and minocyclins, concluding that they can lead to increased BDNF levels and target the GR (ADZIC *et al.*, 2018).

Evidences about the use of anti-inflammatory agents in depressive symptoms have been reported by several studies. However, despite the potential benefit, it's essential to consider the risks and side effects when using anti-inflammatory agents as monotherapy (ADZIC *et al.*, 2018).

3.5. Glutamatergic system

Glutamate is the most abundant excitatory neurotransmitter in the central nervous system being involved in multiple brain functions, such as neurogenesis and neuronal survival. It acts on two different classes of receptors: ionotropic glutamate receptors, a ligand gated ion channel which includes three subtypes – NMDA, AMPA and kainate – and metabotropic glutamate receptors (mGluRs) also known as G-protein coupled receptors also subdivided into three groups – group 1 (mGluR1 and mGluR5), group 2 (mGluR2 and mGluR3), and group 3 (mGluR4, mGluR6, mGluR7 and mGluR8) – according to their similarity and intracellular signalling mechanisms (LI, C. T. *et al.*, 2018, MURROUGH *et al.*, 2017, PYTKA *et al.*, 2016).

Several studies indicate that glutamatergic transmission hypothesis, namely excessive glutamate release, could be related to MDD, though the results are inconclusive. After chronic stress conditions, glutamate release enhances and consequently there is an excessive activation of their receptors in limbic/cortical areas. This excitotoxicity of glutamate contributes to an alteration in neuronal transmission which has been associated with neurobiology of depression (DUMAN *et al.*, 2016, MURROUGH *et al.*, 2017). In addition, changes in the expression of the glutamate receptors in brain regions have also been reported (LI, C. T. *et al.*, 2018).

As mentioned above, NMDA receptors have been studied as a possible new target for the treatment of depression. Subanaesthetic doses of ketamine and amantadine, a non-selective NMDA receptor antagonist, can produce a rapid, effective and potent antidepressant effect maintaining neuroplasticity. This could be an essential alternative in TRD, but their long-term safety is questionable since chronic use could be responsible for neurotoxic effects; so, further

studies are needed (HUANG *et al.*, 2017, MURROUGH *et al.*, 2017, PALUCHA-PONIEWIERA, 2018, REUS *et al.*, 2016).

Notably, from these discoveries, glutamate receptors (essentially mGlu) have been explored for their potential as recent ADs. mGluR2/3 and mGluR5 antagonists have shown rapid ketamine-like antidepressant effects in preclinical models and may have therapeutic potential in depression (CHAKI *et al.*, 2013, CHAKI and FUKUMOTO, 2018, HUANG *et al.*, 2017, LI, C. T. *et al.*, 2018).

3.6. Circadian rhythms dysfunction

Since the 90's, studies on circadian rhythms have multiplied in order to deepen knowledge in this area as well as its potential as a possible therapeutic target.

Responsible for the circadian rhythms and endogenous cyclic oscillations, the master circadian pacemaker of the body, also known as master clock, is located in the SCN of the anterior hypothalamus (MOORE, 1997, WEAVER, 1998).

The SCN neurons are synchronised to the master clock, which receives 24-hour information about light/dark cycle through the retinal ganglion cells, regulating both physiological and behavioural rhythms, including body temperature, sleep patterns and hormones secretion (REPPERT and WEAVER, 2002). Nevertheless, regarding specific tissues and their physiological functions, they are likely regulated by peripheral circadian oscillators which vary between different tissues. In turn, the master clock constantly coordinates and re-synchronises all these peripheral mechanisms (ITO and TOMIOKA, 2016).

Up to date, several studies demonstrate that the circadian function is frequently dysregulated in depressive patients, suggesting an association between the circadian desynchronization and the severity of depressive symptoms (GRANDIN *et al.*, 2006). In contrast, disruptions in the circadian rhythms have been suggested to be a possible cause of MDD development as jet lag and shift work conditions are responsible for disrupt the internal homeostasis (KATZ *et al.*, 2002). Therefore, it is currently unclear if depression is a cause or a consequence of circadian disruption. These are some subjects in focus on this monograph, as we will see below.

4. Chronobiological theories

Alterations in circadian rhythms, rapid eye movement (REM) and non-REM sleep, core body temperature and hormones secretion such as cortisol and melatonin are frequently related to depressive episodes.

4.1. REM and non-REM sleep

Sleep quality is essential to physical and psychological well-being of the population and their deregulation leads to health problems such as depression. A complex mechanism is behind the sleep whose cycles consists of alternating periods of REM and non-REM that is repeated four to five times. Non-REM sleep is composed of three stages (N1, N2, N3), being that N3 is also known as slow wave sleep (SWS). At the beginning, in the first sleep cycle, the REM sleep is relatively short while SWS dominates. However, during the night, REM period increases and non-REM decreases (STEIGER and PAWLOWSKI, 2019).

Some alterations in the depressed subjects sleep electroencephalogram (EEG) have been described. Patients with depression often show lower sleep efficiency characterised by frequent nocturnal and early morning awakenings (ARGYROPOULOS and WILSON, 2005, NUTT *et al.*, 2008).

In comparison to non-depressed subjects, the REM latency, i.e. the interval between sleep onset and the occurrence of the first REM episode, is shortened in depressed subjects. Moreover, an increased total REM sleep time and REM density (frequency of rapid eye movements per REM period) are usual, particularly during first REM period (ARMITAGE, 2007, PALAGINI *et al.*, 2013, SHAFFERY *et al.*, 2003, STEIGER and PAWLOWSKI, 2019). This intensification of REM sleep is also accompanied by changes in non-REM sleep, especially decreased stage N2 and SWS production and reduced EEG delta power, i.e. slow wave activity (SWA) (GERMAIN and KUPFER, 2008, PALAGINI *et al.*, 2013, STEIGER and PAWLOWSKI, 2019). Therefore, REM sleep alterations have been considered as important biomarkers of depression (WANG *et al.*, 2015).

Throughout the lifespan, there are several changes that are related to the onset of depressive disorders, for instance, alterations in sleep patterns. In older people, the circadian mechanism becomes less efficient, since they sleep less, and the night-time awakening increases according to the phenomenon of sleep fragmentation i.e spend more time in N1 and N2 stages than in SWS (GULIA and KUMAR, 2018, LOGAN and MCCLUNG, 2019). So, enhance of daytime

sleepiness could be reflected in their tendency to have a mid-afternoon nap (GULIA and KUMAR, 2018).

4.2. Melatonin and core body temperature (CBT)

Melatonin, known as the “sleep” hormone, is synthesized and released by the pineal gland and is regulated by the SCN clock, where melatonergic receptors are expressed. It regulates various biological processes like body temperature, cortisol secretion and sleep-wake cycles. In this way, it has been used as a marker of circadian phase since its production is inhibited by light exposure, being minimal during the day, and significantly enhanced at night (Figure 3) (PEVET and CHALLET, 2011).



Figure 3. Graph of melatonin and cortisol secretion along the day. Cortisol has an inverse relationship with melatonin.

The dim light melatonin onset (DLMO) is one of the most reliable indicators of the phase of the circadian pacemaker. It corresponds approximately to the onset of synthesis and secretion of melatonin and happens approximately 2-3 hours before sleep onset. Hence it is used to study the melatonin rhythm in patients with a sleep or mood disorder (HASLER *et al.*, 2010, PANDI-PERUMAL *et al.*, 2007).

As the nocturnal levels of melatonin in depressed individuals are decreased in comparison to healthy individuals as well as the peak of melatonin phase shows a considerable delay, melatonin deficiency has been related to the incidence of MDD (KHALEGHIPOUR *et al.*, 2012). Phase-delayed is characterised by a shorter interval between the timing of DLMO and midsleep and a longer time between midsleep and the core body temperature minimum (CBTmin). At this point, findings from Lewy’s study in patients with SAD demonstrated that the interval between DLMO and the average midsleep time, named phase angle difference (PAD), is related with depressive disorders (LEWY *et al.*, 2007). Furthermore, another study positively correlated depression severity with the interval extension between midsleep and the CBTmin, as well as the interval between DLMO and CBTmin (Figure 4). So, the longer the

delay in the DLMO the greater the severity of depression (HASLER *et al.*, 2010). However, a recent study differentiates this relationship according to gender (SWANSON *et al.*, 2017).

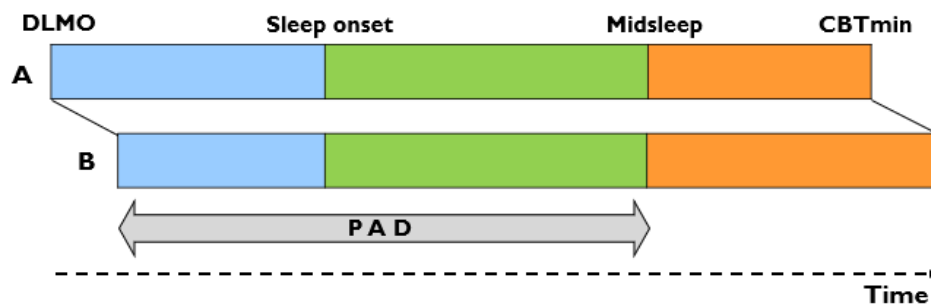


Figure 4. A schematic diagram of significant phase angles and the differences between healthy (A) and depressed (B) subjects. It was possible to verify a DLMO delay and increase of midsleep-CBTmin phase angle in depressed people (adapted from Lewy *et al.*, 2007 and Hasler *et al.*, 2010).

Evidence also suggests that elderly people show a phase-advancement of the sleep-wake cycle and declines in the amplitude of circadian markers such as melatonin peak as well as CBT (COSTA *et al.*, 2013, GULIA and KUMAR, 2018, LOGAN and MCCLUNG, 2019).

It is thought that the circadian activity disruption could be associated with age essentially due to the dysfunction and desynchronization of SCN signalling (COSTA *et al.*, 2013, LOGAN and MCCLUNG, 2019). In the ageing, it is verified a reduction of photoreception due to pupillary miosis and a decrease of pineal function and number of vasopressin-expressing cells in the SCN. All these factors can cause poor feedback on SCN. Its interconnection to the pineal gland is impaired, leading to problems for downstream signalling that could be related to decreased melatonin secretion. Finally, peripheral clocks degeneration also takes place in the elderly (COSTA *et al.*, 2013, LOGAN and MCCLUNG, 2019, MATTIS and SEHGAL, 2016). All these alterations are associated with a higher developing of sleep problems enhancing the risk of depression.

4.3. Cortisol

In healthy people, cortisol levels are normally high in the morning, after a long period of sleep, and drop constantly and regularly throughout the day, reaching lower values in the late evening. In opposition, as previously mentioned, depressed individuals present hypercortisolaemia, characterised by the high cortisol levels in the morning, with a larger

cortisol awakening response and a high, flat pattern of cortisol secretion during the day (DIENES *et al.*, 2013).

4.4. Genetic mechanisms

The discovery of genetic mechanisms underlying circadian rhythms shared by three American scientists was target of Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2017. The clock-controlled genes interactions with each other allow to generate oscillations of gene expression and make up an auto-regulatory transcriptional-translational feedback loop of core clock genes (JAGANNATH *et al.*, 2017). Several studies have highlighted that these cellular clocks are probably responsible for regulating a wide variety of biological, physiological and behavioural functions. These processes are mediated by endogenous and exogenous factors. The formers are related to genetic factors including biological pacemakers and they support the rhythmicity of physiological and psychological processes such as core body temperature, food ingestion and mood. On the other hand, environmental factors, such as light/dark alterations, sleep/wake, hot/cold and seasonal changes, modulate the exogenous factors (CHARRIER *et al.*, 2017, JAGANNATH *et al.*, 2017).

A core set of clock genes have been proposed in humans as being involved in the biological rhythms at the molecular level and having a central role in virtually generate all rhythms throughout the body. The most relevant are Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (*CLOCK*), Brain muscle ARNT-like protein I (*BMAL1/ARNTL1*), Period (*Per1* and *Per2*), which was found for the first time in drosophila, and Cryptochrome (*Cry1* and *Cry2*) (BUNNEY *et al.*, 2015, CHARRIER *et al.*, 2017, CHRISTIANSEN *et al.*, 2016). These genes are widely expressed in several brain regions, including in limbic system involved in human mood regulation (BERTON and NESTLER, 2006).

The circadian rhythm is produced at the molecular level and begins in the nucleus by *CLOCK* (or Neuronal Pas domain protein (*NPAS2*) – a paralog of *CLOCK*) which dimerizes with *BMAL1*. The heterodimer *CLOCK/BMAL1* binds directly to Enhancer boxes (E-boxes) containing promoters on *Per* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) and *Cry* genes (*Cry1*, *Cry2*) and induces its expression. *Per* and *Cry* mRNAs move into the cytoplasm and their protein products heterodimerize (*PER/CRY*) forming a complex with casein kinase I ϵ (CKI ϵ) which contributes to the phosphorylation of specific sites that allows their return into the nucleus. Afterwards, the complex is responsible to repress their own transcription by interacting in a feedback loop with the positive transcription factors (*CLOCK/BMAL1* heterodimer) that stimulate *Per* and *Cry*

transcription, which act as the negative components in this mechanism (BUNNEY *et al.*, 2015, CHARRIER *et al.*, 2017, JAGANNATH *et al.*, 2017, LOWREY and TAKAHASHI, 2011). The *CRY/PER/CKI ϵ* protein complex levels vary throughout the day, reaching peak at nightfall and decreasing at dawn. It is still known a post-transcriptional mechanism in which *Per* and *Cry* are phosphorylated targets of several kinase proteins (*CKI ϵ* and *CKI δ*) and undergo degradation by Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) (Figure 5) (CHARRIER *et al.*, 2017, ENG *et al.*, 2017, LOWREY and TAKAHASHI, 2011).

In addition, there is also a secondary feedback loop, formed by the nuclear receptors *Rev-erb α* and *Retinoic acid-related orphan receptor alpha (Ror α)*, which modulate the *BMAL1* rhythmicity. *ROR α* activates *BMAL1* transcription while *REV-ERB α* represses it and their levels vary through the day (Figure 5) (CHARRIER *et al.*, 2017, JAGANNATH *et al.*, 2017, MOHAWK *et al.*, 2012). The peak of *ROR α* is verified at dawn and *REV-ERB α* peaks at nightfall. Thus, this balance assures that *BMAL1* levels increase at nightfall, peak at dawn and reach the valley before nightfall, instead to what happens with *Cry* and *Per* (JAGANNATH *et al.*, 2017). Finally, a tertiary feedback loop is known, where the *Dec* gene also inhibit *CLOCK/BMAL1* transcription reinforcing the action of complex *CRY/PER/CKI ϵ* (Figure 5) (JAGANNATH *et al.*, 2017).

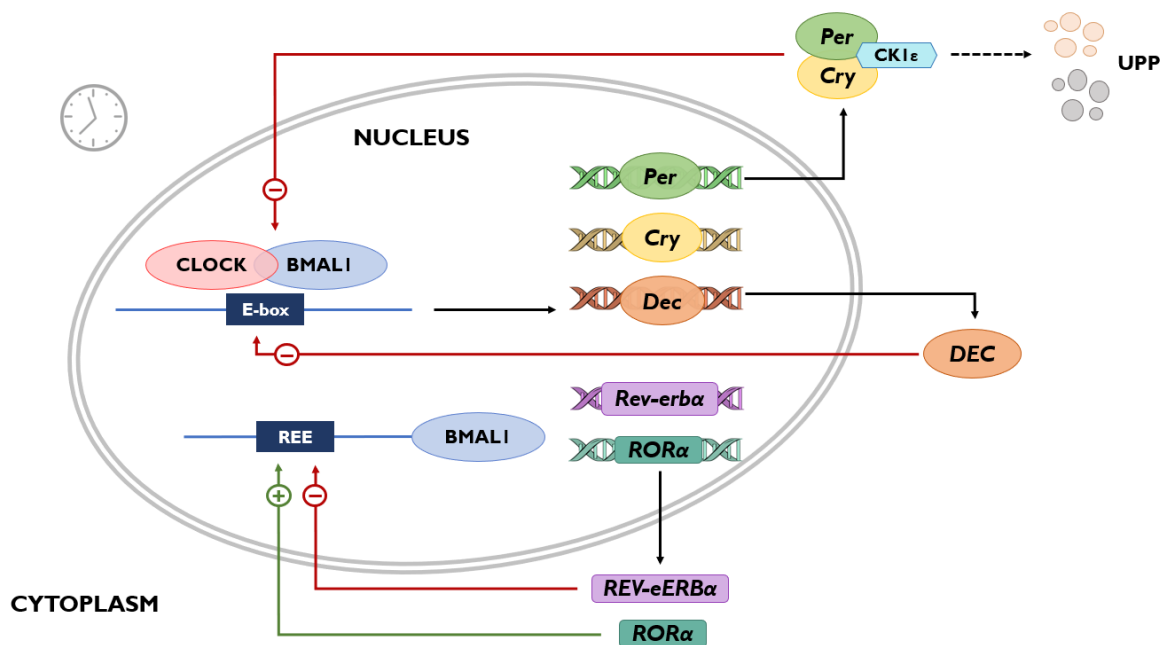


Figure 5. Schematic representation of main clock genes action believed to be involved in the circadian rhythm (adapted from CHARRIER *et al.*, 2017 and JAGANNATH *et al.*, 2017).

Since clock genes are associated with circadian rhythms, their impairments and alterations have obviously been correlated to the development of a range of disorders. But, what genetically happens throughout depressive disorders development?

Several systematic reviews have been performed in order to deepen and compile the most important discoveries related to genetic polymorphism. Charrier *et al.* (2017) reported that the most frequent type of genetic variation associated with MDD is the single nucleotide polymorphism (SNP), a DNA sequence variation occurring when a single nucleotide is replaced with another, in nucleus circadian clock genes. *Clock*, *Per*, *Cry* and *Bmall* are the major clock genes identified as being altered and involved in depression-related disorders (CHARRIER *et al.*, 2017, ZAKI *et al.*, 2018).

Although the *CLOCK* gene, located on chromosome 4, is the most well studied gene, to date few associations were reported between their SNP and MDD (MELHUIISH BEAUPRE *et al.*, 2018). Shi *et al.* (2016) associated a polymorphism in *CLOCK* (rs1801260), located in 3'-URT regions of the gene, with MDD in males. Furthermore, higher *CLOCK* mRNA levels were found in individuals with a history of depression compared with healthy controls (GOUIN *et al.*, 2010).

Per1, *Per2* and *Per3* are clock genes known to be transcriptional repressors. Despite of the found higher mRNA levels of *Per1* and *Per2* SNPs (LAVEBRATT *et al.*, 2010), these results didn't present high statistical significance. Only *Per3* showed interesting results with their association with MDD (SHI *et al.*, 2016).

Other studies have demonstrated that polymorphisms of *Cry1* and *Cry2* genes are associated with depressive disorders (see Table 1). According to Lavebratt *et al.* (2010), dysregulation of *Cry2* expression is related to the susceptibility of depression. Sleep deprivation is responsible for decreasing *Cry2* mRNA expression in subjects with depressive state of BD compared with healthy controls, whose *Cry2* mRNA levels increase after total sleep deprivation. Therefore, reduced mRNA levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells are a parameter that could be used as depression indicator (LAVEBRATT *et al.*, 2010). A robust study in a Swedish population (N=5596) further associated two SNPs in *Cry2* (rs7123390 and rs2292910) with MDD (KOVANEN *et al.*, 2017).

Npas2 gene has probably an effect on mood regulation and sleep homeostasis as well as on the maintenance of molecular rhythmicity (SORIA *et al.*, 2010). An association was found between *Per2*, *Cry2*, *Bmall* and *Npas2* polymorphisms and patients with SAD, namely winter

depression (CHARRIER *et al.*, 2017, COSTA *et al.*, 2013, JOHANSSON *et al.*, 2003, PARTONEN *et al.*, 2007).

It is also noteworthy that sleep and mental disorders are associated to shift work disorders which also have changes in clock genes patterns, such as Per1 intronic polymorphism (CHARRIER *et al.*, 2017, TANIYAMA *et al.*, 2015) and Cry1 polymorphisms whose levels curiously were different between day workers and night workers (RESZKA *et al.*, 2013). So, disruption of circadian rhythms is closely related to brain disorders such as depression (LOGAN and MCCLUNG, 2019).

These different levels of gene expression could further be found in some brain regions outside the SCN (LI, J. Z. *et al.*, 2013).

The reviews up today published regarding clock genes and depression related disorders are summarized in Table I.

Clock genes alterations might both lead to abnormal clock genes rhythmicity and development of psychiatric disorders. Disruptions of the mechanisms underlying the circadian clock system are associated with depression incidence (BUNNEY *et al.*, 2015, CHARRIER *et al.*, 2017). Despite all these discoveries, the results of several studies are inconclusive, requiring more investigations to assess the clinical impact of circadian genes dysregulation in depressive disorders.

Table 1. Literature review of the main genes related to depressive disorders (adapted from CHARRIER *et al.*, 2017).

Gene(s)	Main alterations	References
NPAS2	A circadian clock-related polymorphism NPAS2 471 Leu/Ser has been related to the development of SAD.	(JOHANSSON <i>et al.</i> , 2003)
Per2, ARNTL and NPAS2	Polymorphisms in the three circadian clock genes Per2, ARNTL and NPAS2 were associated with the pathogenesis of SAD.	(PARTONEN <i>et al.</i> , 2007)
CRY2	CRY2 SNPs and dysregulation of gene expression were associated with winter depression. Lowered expression levels of CRY2 mRNA were observed in Peripheral Blood Mononuclear Cells from depressed patients with BD.	(LAVEBRATT <i>et al.</i> , 2010)
CRY1 and NPAS2	SNPs in CRY1 (rs2287161) and NPAS2 (rs11123857) genes were associated with unipolar major depression in MDD subsample.	(SORIA <i>et al.</i> , 2010)
CLOCK, Perl and BMAL1	Individuals with a history of depression had higher CLOCK, Period1, and BMAL1 mRNA levels in peripheral blood leukocytes (PBLs) compared to non-depressed participants.	(GOUIN <i>et al.</i> , 2010)
TIMELESS	Significant TIMELESS variants were reported as gender-specific: association with depression with fatigue in females and early morning awakening in males.	(UTGE <i>et al.</i> , 2010)
ARNTL, PER1, PER2, PER3 and REV-ERB α	Genes involved in daily rhythms were identified in the human brain and are dysregulated in MDD since they present an abnormal phasing of circadian gene expression.	(LI, J. Z. <i>et al.</i> , 2013)
CRY1 and Tef	Cry1 (rs228716) and Tef (rs738499) polymorphisms were associated with the susceptibility of MDD.	(HUA <i>et al.</i> , 2014)
CLOCK and Per3	Genetic polymorphisms of the circadian genes CLOCK and Per3 were related with the development major depression in a sex- and stress-dependent manner.	(SHI <i>et al.</i> , 2016)
Per3	A rare genetic polymorphism in Per3 can alter response to antidepressant treatment, namely SSRIs.	(DALLASPEZIA <i>et al.</i> , 2016)
Per2 and Bmal1	Altered expression pattern of clock genes Per2 and Bmal1, in several sub oscillators of the rat brain and in the liver.	(CHRISTIANSEN <i>et al.</i> , 2016)
PERIOD3	Two rare variants in the PERIOD3 (PER3-P415A/H417R) gene were identified in subjects with altered sleep rhythm. These variants may also play a role in a SAD.	(ZHANG, L. <i>et al.</i> , 2016b)
CRY2 and PRKCDBP	Association of CRY2 variants with dysthymia and MDD. Additionally, protein kinase C delta binding protein (PRKCDBP) SNP (rs1488864) was also related to MDD.	(KOVANEN <i>et al.</i> , 2017)

5. Genetic polymorphism of enzymes on depression

Drug metabolising enzymes (DMEs) include several proteins that play a central role in the metabolism of exogenous and endogenous compounds, such as xenobiotics, drugs, food toxicants and steroids. In accordance with their biotransformation reaction types, DMEs are classified into Phase I, Phase II and Phase III. While phase I DMEs include the cytochrome P450 (CYP450) superfamily as well as MAOs, phase II DMEs consist of another superfamily of enzymes such as sulfotransferases and UDP-glucuronosyltransferases. Additionally, phase III DMEs are a group of membrane transporters including P-glycoprotein (P-gp) (XU *et al.*, 2005).

5.1. Cytochrome P450 (CYP450) enzymes

The CYP450 hepatic metabolism enzyme system is also a pharmacokinetic responsible for governing antidepressant CNS bioavailability. CYP2D6 and CYP2C19 are enzyme subtypes involved mainly in the metabolism of some ADs and their polymorphisms were related to enzyme activity. According to the genotype, it was possible to estimate the phenotype into different metabolization levels, which is important to consider when prescribing antidepressants (SINGH, 2015). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines recommended that genotyping tests of polymorphisms in these two genes allow classifying the metabolizers into poor, intermediate, extensive and ultra-rapid (HICKS *et al.*, 2017).

Genetic variations in CYP2D6 and/or CYP2C19 can influence the metabolism of SSRIs and TCA, thereby changing pharmacokinetic parameters and affecting treatment outcomes (HICKS *et al.*, 2015, HICKS *et al.*, 2017). Table II demonstrates some of these examples.

Table II. Implications and therapeutic recommendations for some example of phenotypes of the main antidepressants SSRIs (a) and TCA (b) metabolizers enzymes (adapted from HICKS *et al.*, 2015 and HICKS *et al.*, 2017).

Antidepressant Drug	Phenotype	Implication	Therapeutic recommendation
Paroxetine ^a	CYP2D6 Ultrarapid metabolizer	Lower plasma concentrations may be a risk of therapeutic failure.	Select an SSRI not predominantly metabolised by CYP2D6.
Citalopram and escitalopram ^a	CYP2C19 Poor metabolizer	Higher plasma concentration may increase the risk of side effects.	Consider a 50% reduction of the initial dose or select a SSRI not predominantly metabolised by CYP2C19.
Amitriptyline ^b	CYP2D6 Poor metabolizer	Elevated TCA plasma concentration due to reduced metabolism lead to an increase in the occurrence of side effects.	Avoid tricyclic use due to its increased side effects. However, if a TCA is warranted, consider a 50% reduction of the initial dose. Therapeutic monitoring is recommended to guide dose adjustments.
	CYP2C19 Ultrarapid and rapid metabolizers	Lower TCA plasma concentration due to increased metabolism with greater conversion of tertiary to secondary amines may affect response or side effects.	Avoid tricyclic use due to the sub-optimal response. Consider TCAs not mainly metabolised by CYP2C19 like nortriptyline. However, if a tertiary amine is warranted, therapeutic monitoring is recommended to guide dose adjustments.

Paroxetine is an SSRI extensively metabolised by CYP2D6. Polymorphisms in this gene may result in increase or decrease of these drugs metabolism. For example, the paroxetine plasma concentrations are lower/undetectable by CYP2D6 ultrarapid metabolizers phenotype when compared to CYP2D6 extensive metabolizers, which may increase probability of therapeutic failure. So, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium recommendation is to select alternative SSRI not extensively metabolised by CYP2D6 (Table II) (HICKS *et al.*, 2015).

The TCAs are divided into two major groups in accordance to their chemical structure: tertiary and secondary amines. Secondary amines (e.g., nortriptyline) result from the metabolism by CYP2C19 of tertiary amines (e.g., amitriptyline). Additionally, CYP2D6 is

responsible for the metabolism of both tertiary and secondary amines. Therefore, it is important to take into account the polymorphisms in both genes since CYP2D6 and CYP2C19 poor or ultrarapid metabolizers may have tricyclic plasma concentrations outside the defined therapeutic range for TCAs, thus increasing the probability of therapeutic failure or experiencing side effects. Therapeutic drug monitoring may be advised (HICKS *et al.*, 2017).

According to the combinatorial gene-based dosing recommendations, the use of amitriptyline should be avoided in a patient with CYP2D6 ultrarapid metabolism and CYP2C19 normal metabolism. However, when amitriptyline is warranted, it is necessary to consider titrating to a higher target dose (HICKS *et al.*, 2017).

Strategies based on genotyping tests of polymorphisms have a potential benefit in some patients with TRD treated with drugs metabolised by these cytochromes since the dose adjustments lead to successful therapy (FABBRI *et al.*, 2019).

5.2. Transporters superfamilies

The membrane transporters are classified according to localisation, substrate specificity, homology, energy source required for transport and physiological function. There are generally divided into two main superfamilies, ABC (ATP-binding cassette) and SLC (Solute Carrier) transporters. In addition, OATPs (Organic anion transporting polypeptides), formerly referred to as SLC21A, are transporters belonging to the SLCO (Organic Solute Carrier) superfamily (GIACOMINI and SUGIYAMA, 2006).

ABC transporters are one of the largest transmembrane protein superfamilies with ATPase activity that bind ATP and use the energy to drive the transport of substrates across a biological cellular membrane where they are inserted. A functional ABC transporter is characterised by four domains: two nucleotide-binding-domains, where ATP binding and hydrolysis occurs, and two transmembrane domains (WILKENS, 2015). Nowadays, are known 49 ABC genes in the human genome subdivided into seven subfamilies, designated A to G (distinguishable by sequence homology). Each subfamily is responsible for different roles in cellular processes (VASILIOU *et al.*, 2009). They are expressed throughout the brain, BBB, and regulate the influx/efflux of various substances. One of the functions of the ABC transporters is the participation in drugs detoxification and protection of the brain from toxic compounds (WILKENS, 2015).

Recently, SLC transporters have been progressively studied as a target for several drugs, such as SSRIs for depression (COLAS *et al.*, 2016, RIVES *et al.*, 2017). There are 418 SLC human transporters divided into 52 gene families that mediate the transport of ions and nutrients across the biological membrane using different mechanisms (COLAS *et al.*, 2016, LIN, L. *et al.*, 2015, RIVES *et al.*, 2017). These transporters are also important for drug absorption, distribution, metabolism, and excretion (COLAS *et al.*, 2016) and are located throughout the body, for example in the BBB, choroid plexus, liver, intestine, kidney, and placenta (MORRIS *et al.*, 2017).

This review is primarily focused on the ABCB1 gene since they are closely linked to AD resistance.

P-gp, also known as multidrug resistance protein 1 (MDR1), is a glycoprotein encoded by the ABCB1 gene in humans that transports drugs across the BBB being so an interesting candidate widely studied in response to CNS drugs such as antidepressants. In this way, the entrance of the P-gp substrate antidepressants into the brain could be limited, being the brain concentrations of many antidepressants dependent on P-gp. Drug efflux transporters such as P-gp and several members of the multidrug resistance protein family are evidently responsible for limit the entry of drugs and accumulation into the CNS essentially when their overexpression occurs (LOSCHER and POTSCHKA, 2005). Studies demonstrate a significant decrease of [¹¹C]verapamil in medicated depressed patients indicating that P-gp function is increased in prefrontal and temporal regions. These alterations could limit the access of ADs to the brain, therefore potentially contributing to the development of pharmacoresistance (O'BRIEN *et al.*, 2012, QOSA *et al.*, 2015). The main signalling pathways that regulate expression and activity of ABC efflux transporters at the BBB are inflammatory stress, oxidative stress, xenobiotics and glutamate and their dysregulation could be related to neurological diseases. Firstly, long-term exposure to inflammatory stress is characterised by high concentrations of inflammatory mediators being TNF- α or LPS responsible for activating the NF- κ B pathway through ET-1 release. Likewise, oxidative stress, another stressor, and glutamate also trigger activation of NF- κ B pathway with nuclear translocation resulting in increase of efflux transporters expression/activity, particularly P-gp. Finally, treatment with xenobiotics like antidepressants can also increase ABC transporters expression with nuclear receptor activation. So, administration of P-gp inhibitors is thought to increase the effects of certain antidepressants, namely in TRD (O'BRIEN *et al.*, 2012, QOSA *et al.*, 2015).

Several studies have analysed transporters' SNPs and their association with antidepressant treatment, assessing their importance in clinical practice.

Genetic polymorphisms within the *ABCB1* gene predict individual differences in antidepressant response. A BRÜCKL and UHR (2016) review has documented a list of studies examining the association between *ABCB1* polymorphism and response to antidepressants in humans. This study determined that minor allele carriers respond better to antidepressant treatment than noncarriers. Intronic SNPs rs2032583 and rs2235040 and exonic SNP rs1045642 (C3435T) are the most frequently associated with antidepressant treatment response (BRÜCKL and UHR, 2016). For example, a study conducted by UHR *et al.* (2008) reported that rs2032583 C carriers treated with substrates of P-gp exhibit a higher remission of depressive symptoms than TT genotype (UHR *et al.*, 2008). TT polymorphism of the rs1045642 SNP (C3435T), resulting from the exchange of cytosine by a thymine, lead to the production of a codon (ATT than ATC) that does not change the expressed amino acid isoleucine and decreases *ABCB1* efflux functioning. In turn, rs1045642 polymorphisms with C carriers proved to be necessary double the dose of escitalopram, a P-gp substrate, to remit from MDD (SINGH, 2015). A recent study that analyses rs2032582 (G2677T) polymorphism demonstrated that patients carrying at least one T allele evidence a significantly enhanced paroxetine therapeutic efficacy (VANCOVA *et al.*, 2018).

In normal ageing, several disturbances in BBB integrity can contribute to the progression of neurological diseases. Increased thickness of endothelial cells capillary wall and cerebrovascular basement membrane, decreased number of endothelial cells and expression of tight junction proteins and production of high levels of neurotoxic and proinflammatory mediators like cytokines by microglia leading to deterioration of synaptic plasticity and neuronal damage are some of the alterations that compromise the BBB (ERDO *et al.*, 2017, PAN and NICOLAZZO, 2018). The expression and function of P-gp at the BBB also decreases with ageing, contributing to higher permeability of BBB and increasing the influx of xenobiotics, which could be harmful to the brain (BORS *et al.*, 2018, CHIU *et al.*, 2015). BAUER *et al.* (2017) analysed, through the positron emission tomography, the influence of age on *ABCB1*-mediated drug-drug interaction at the BBB. This study used the model *ABCB1* substrate (R)-[¹¹C]verapamil determining its total distribution volume (V_t) before and after administration of a low dose of a third-generation *ABCB1* inhibitor, tariquidar. In conclusion, it was verified that in the elderly subjects occurs a higher increase in the brain uptake of (R)-[¹¹C]verapamil after partial (incomplete) *ABCB1* inhibition and an increased risk of *ABCB1*-mediated drug-drug interaction at the BBB in comparison to younger subjects (BAUER *et al.*, 2017).

6. Conclusions and future perspectives

After a better understanding of depression and its pathophysiology, it is essential to understand the current available pharmacotherapies and why TRD occurs so frequently. MDD is a complex pathology, whose pharmacological treatment is associated to high intra- and inter-variability. Therefore, the underlying mechanisms must be identified in order to rationally individualize the therapy. In this context, models for assessing antidepressant treatment response have been built leading to personalised medicine for subjects with MDD (LIN, E. *et al.*, 2018).

The next step perspectives to use the aforementioned information to discover new biomarkers of depression and develop new drugs with novel therapeutic targets. The first step aims to find new biological markers for depression (sleep markers, cytokines and transporters), which are key factors in the individualisation of treatment, as it takes into account the genetic factors of each individual. Since antidepressant response shows a strong genetic component, genetic variants have also been studied as biomarkers able to provide individual antidepressant treatments (FABBRI *et al.*, 2019). In the future, better efficiency of the treatment for MDD will probably be achieved through new technologies that provide the identification of key factors, such as biomarkers of depression. SNP studies, as well as protein and metabolomic studies, have identified genes, interleukins (such as IL-6 and IL-1 β) and metabolites, respectively, which are related to depression and drug response (GADAD *et al.*, 2018).

While mechanisms concerning the ageing remain to be elucidated, it is essential to consider drugs adjustment in elderly because they are generally polymedicated. Additionally, improving sleep quality and achieve new therapeutic strategies are essential to improve the quality of life of older adults with depressive disorders.

Recommended by recent guidelines, chronotherapy is also a possible strategy to regulate depressive symptoms, controlling the contact to external environmental stimuli that determine the biological clock. Chronotherapy refers to nonpharmaceutical treatments such as light and dark therapy, sleep deprivation or wake therapy and sleep phase advance. Aiming to restore the balance of serotonin and melatonin this therapy has been documented as effective in the treatment of depression by several studies (KHALIFEH, 2017).

Fortunately, several compounds have been recently investigated and new drugs approved for the treatment of depression, namely for the TRD. However, to treat depression faster and

more effectively in all patients, future studies are required to discover new drugs and specific/valid genetic biomarkers of TRD.

References

- AAN HET ROT, M., MATHEW, S. J., CHARNEY, D. S. - **Neurobiological mechanisms in major depressive disorder.** CMAJ. 180. 3 (2009) 305-13.
- ADZIC, M., BRKIC, Z., MITIC, M., FRANCIJA, E., JOVICIC, M. J., RADULOVIC, J., MARIC, N. P. - **Therapeutic Strategies for Treatment of Inflammation-related Depression.** Curr Neuropharmacol. 16. 2 (2018) 176-209.
- AMODEO, G., TRUSSO, M. A., FAGIOLINI, A. - **Depression and Inflammation: Disentangling a Clear Yet Complex and Multifaceted Link.** Neuropsychiatry 7 (4). (2017) 448-457.
- ANDERSON, I. M., HADDAD, P. M., SCOTT, J. - **Bipolar disorder.** BMJ. 345. (2012) e8508.
- ARGYROPOULOS, S. V., WILSON, S. J. - **Sleep disturbances in depression and the effects of antidepressants.** Int Rev Psychiatry. 17. 4 (2005) 237-45.
- ARMITAGE, R. - **Sleep and circadian rhythms in mood disorders.** Acta Psychiatr Scand. 115. (433) (2007) 104–115.
- ARNETT, M. G., MUGLIA, L. M., LARYEA, G., MUGLIA, L. J. - **Genetic Approaches to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation.** Neuropsychopharmacology. 41. 1 (2016) 245-60.
- ASSOCIATION, AMERICAN PSYCHIATRIC - **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition (DSM-5).** Arlington, VA, USA: American Psychiatric Publishing, 2013.
- BĂDESCU, SV., TĂTARU, C., KOBYLINSKA, L., GEORGESCU, EL., ZAHIU, DM., ZĂGREAN, AM., ZĂGREAN, L. - **The association between Diabetes mellitus and Depression.** Journal of Medicine and Life. 9. 2 (2016) 120-125.
- BANKS, W. A. - **Blood-Brain Barrier Transport of Cytokines: A Mechanism for Neuropathology.** Current Pharmaceutical Design. 11. (2005) 973-984.
- BAUER, M., WULKERSDORFER, B., KARCH, R., PHILIPPE, C., JAGER, W., STANEK, J., WADSAK, W., HACKER, M., ZEITLINGER, M., LANGER, O. - **Effect of P-glycoprotein inhibition at the blood-brain barrier on brain distribution of (R)-[(11) C]verapamil in elderly vs. young subjects.** Br J Clin Pharmacol. 83. 9 (2017) 1991-1999.

- BERTON, O., NESTLER, E. J. - **New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines.** Nat Rev Neurosci. 7. 2 (2006) 137-51.
- BORS, L., TOTH, K., TOTH, E. Z., BAJZA, A., CSORBA, A., SZIGETI, K., MATHE, D., PERLAKI, G., ORSI, G., TOTH, G. K., ERDO, F. - **Age-dependent changes at the blood-brain barrier. A Comparative structural and functional study in young adult and middle aged rats.** Brain Res Bull. 139. (2018) 269-277.
- BRÜCKL, TM., UHR, M. - **ABCBI genotyping in the treatment of depression.** Pharmacogenomics. 17. 18 (2016) 2039-2069.
- BUNNEY, B. G., LI, J. Z., WALSH, D. M., STEIN, R., VAWTER, M. P., CARTAGENA, P., BARCHAS, J. D., SCHATZBERG, A. F., MYERS, R. M., WATSON, S. J., AKIL, H., BUNNEY, W. E. - **Circadian dysregulation of clock genes: clues to rapid treatments in major depressive disorder.** Mol Psychiatry. 20. 1 (2015) 48-55.
- BYLICKY, M. A., MUELLER, G. P., DAY, R. M. - **Mechanisms of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury.** Oxid Med Cell Longev. 95. (2018) 43-49.
- CALCIA, M. A., BONSALE, D. R., BLOOMFIELD, P. S., SELVARAJ, S., BARICHELLO, T., HOWES, O. D. - **Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness.** Psychopharmacology (Berl). 233. 9 (2016) 1637-50.
- CATTANEO, A., MACCHI, F., PLAZZOTTA, G., VERONICA, B., BOCCHIO-CHIAVETTO, L., RIVA, M. A., PARIANTE, C. M. - **Inflammation and neuronal plasticity: a link between childhood trauma and depression pathogenesis.** Front Cell Neurosci. 9. (2015) 40.
- CHAKI, S., AGO, Y., PALUCHA-PANIEWIERA, A., MATRISCIANO, F., PILC, A. - **mGlu2/3 and mGlu5 receptors: potential targets for novel antidepressants.** Neuropharmacology. 66. (2013) 40-52.
- CHAKI, S., FUKUMOTO, K. - **mGlu receptors as potential targets for novel antidepressants.** Curr Opin Pharmacol. 38. (2018) 24-30.
- CHARRIER, A., OLLIAC, B., ROUBERTOUX, P., TORDJMAN, S. - **Clock Genes and Altered Sleep-Wake Rhythms: Their Role in the Development of Psychiatric Disorders.** Int J Mol Sci. 18. 5 (2017).

- CHIU, C., MILLER, M. C., MONAHAN, R., OSGOOD, D. P., STOPA, E. G., SILVERBERG, G. D. - **P-glycoprotein expression and amyloid accumulation in human aging and Alzheimer's disease: preliminary observations.** *Neurobiol Aging.* 36. 9 (2015) 2475-82.
- CHRISTIANSEN, S.L., BOUZINOVA, E.V., FAHRENKRUG, J., WIBORG, O. - **Altered expression pattern of clock genes in a rat model of depression.** *Int J Neuropsychopharmacol.* 19. (11) (2016).
- COLAS, C., UNG, P. M., SCHLESSINGER, A. - **SLC Transporters: Structure, Function, and Drug Discovery.** *Medchemcomm.* 7. 6 (2016) 1069-1081.
- COSTA, I.C., CARVALHO, H.N., FERNANDES, L. - **Aging, circadian rhythms and depressive disorders: a review.** *Am J Neurodegener Dis.* 2. (4) (2013) 228-246.
- DALLASPEZIA, S., LOCATELLI, C., LORENZI, C., PIROVANO, A., COLOMBO, C., BENEDETTI, F. - **Sleep homeostatic pressure and PER3 VNTR gene polymorphism influence antidepressant response to sleep deprivation in bipolar depression.** *J Affect Disord.* 192. (2016) 64-9.
- DANTZER, R. - **Role of the Kynurenine Metabolism Pathway in Inflammation-Induced Depression: Preclinical Approaches.** *Curr Top Behav Neurosci.* 31. (2017) 117-138.
- DEAN, J., KESHAVAN, M. - **The neurobiology of depression: An integrated view.** *Asian J Psychiatr.* 27. (2017) 101-111.
- DEVANAND, D. P. - **Dysthymic disorder in the elderly population.** *Int Psychogeriatr.* 26. 1 (2014) 39-48.
- DIENES, K. A., HAZEL, N. A., HAMMEN, C. L. - **Cortisol secretion in depressed, and at-risk adults.** *Psychoneuroendocrinology.* 38. 6 (2013) 927-40.
- DOWLATI, Y., HERRMANN, N., SWARDFAGER, W., LIU, H., SHAM, L., REIM, E. K., LANCTOT, K. L. - **A meta-analysis of cytokines in major depression.** *Biol Psychiatry.* 67. 5 (2010) 446-57.
- DUMAN, R. S. - **Ketamine and rapid-acting antidepressants: a new era in the battle against depression and suicide.** *F1000Res.* 7. (2018).

- DUMAN, R. S., AGHAJANIAN, G. K., SANACORA, G., KRYSTAL, J. H. - **Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants.** Nat Med. 22. 3 (2016) 238-49.
- ENG, G. W. L., EDISON, VIRSHUP, D. M. - **Site-specific phosphorylation of casein kinase I delta (CKIdelta) regulates its activity towards the circadian regulator PER2.** PLoS One. 12. 5 (2017) e0177834.
- ERDO, F., DENES, L., DE LANGE, E. - **Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review.** J Cereb Blood Flow Metab. 37. 1 (2017) 4-24.
- EYRE, H. A., AIR, T., PRADHAN, A., JOHNSTON, J., LAVRETSKY, H., STUART, M. J., BAUNE, B. T. - **A meta-analysis of chemokines in major depression.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 68. (2016) 1-8.
- FABBRI, C., CORPONI, F., SOUERY, D., KASPER, S., MONTGOMERY, S., ZOHAR, J., RUJESCU, D., MENDLEWICZ, J., SERRETTI, A. - **The Genetics of Treatment-Resistant Depression: A Critical Review and Future Perspectives.** Int J Neuropsychopharmacol. 22. 2 (2019) 93-104.
- FEKADU, NETSANET, SHIBESHI, WORKINEH, ENGIDAWORK, EPHREM - **Major Depressive Disorder: Pathophysiology and Clinical Management.** Journal of Depression and Anxiety. 06. 01 (2017).
- GADAD, B. S., JHA, M. K., CZYSZ, A., FURMAN, J. L., MAYES, T. L., EMSLIE, M. P., TRIVEDI, M. H. - **Peripheral biomarkers of major depression and antidepressant treatment response: Current knowledge and future outlooks.** J Affect Disord. 233. (2018) 3-14.
- GERHARD, DM., DUMAN, RS. - **Rapid-Acting Antidepressants: Mechanistic Insights and Future Directions.** Curr Behav Neurosci Rep. 5. (1) (2018) 36-47.
- GERMAIN, A., KUPFER, D. J. - **Circadian rhythm disturbances in depression.** Hum Psychopharmacol. 23. 7 (2008) 571-85.
- GIACOMINI, KM., SUGIYAMA, Y. - **Membrane transporters and drug response.** New York: McGraw-Hill, 2006.
- GOUIN, J. P., CONNORS, J., KIECOLT-GLASER, J. K., GLASER, R., MALARKEY, W. B., ATKINSON, C., BEVERSDORF, D., QUAN, N. - **Altered expression of circadian rhythm**

genes among individuals with a history of depression. J Affect Disord. 126. 1-2 (2010) 161-6.

GRANDIN, L. D., ALLOY, L. B., ABRAMSON, L. Y. - **The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation.** Clin Psychol Rev. 26. 6 (2006) 679-94.

GULIA, K. K., KUMAR, V. M. - **Sleep disorders in the elderly: a growing challenge.** Psychogeriatrics. 18. 3 (2018) 155-165.

HAROON, E., DAGUANNO, A. W., WOOLWINE, B. J., GOLDSMITH, D. R., BAER, W. M., WOMMACK, E. C., FELGER, J. C., MILLER, A. H. - **Antidepressant treatment resistance is associated with increased inflammatory markers in patients with major depressive disorder.** Psychoneuroendocrinology. 95. (2018) 43-49.

HAROON, E., MILLER, A. H. - **Inflammation Effects on Brain Glutamate in Depression: Mechanistic Considerations and Treatment Implications.** Curr Top Behav Neurosci. 31. (2017) 173-198.

HASLER, B. P., BUYSSE, D. J., KUPFER, D. J., GERMAIN, A. - **Phase relationships between core body temperature, melatonin, and sleep are associated with depression severity: further evidence for circadian misalignment in non-seasonal depression.** Psychiatry Res. 178. 1 (2010) 205-7.

HICKS, J. K., BISHOP, J. R., SANGKUHL, K., MULLER, D. J., JI, Y., LECKBAND, S. G., LEEDER, J. S., GRAHAM, R. L., CHIULLI, D. L., A, L. LERENA, SKAAR, T. C., SCOTT, S. A., STINGL, J. C., KLEIN, T. E., CAUDLE, K. E., GAEDIGK, A., CLINICAL PHARMACOGENETICS IMPLEMENTATION, CONSORTIUM - **Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors.** Clin Pharmacol Ther. 98. 2 (2015) 127-34.

HICKS, J. K., SANGKUHL, K., SWEN, J. J., ELLINGROD, V. L., MULLER, D. J., SHIMODA, K., BISHOP, J. R., KHARASCH, E. D., SKAAR, T. C., GAEDIGK, A., DUNNENBERGER, H. M., KLEIN, T. E., CAUDLE, K. E., STINGL, J. C. - **Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline (CPIC) for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants: 2016 update.** Clin Pharmacol Ther. 102. 1 (2017) 37-44.

- HUA, P., LIU, W., CHEN, D., ZHAO, Y., CHEN, L., ZHANG, N., WANG, C., GUO, S., WANG, L., XIAO, H., KUO, S. H. - **CryI and Tef gene polymorphisms are associated with major depressive disorder in the Chinese population.** *J Affect Disord.* 157. (2014) 100-3.
- HUANG, Y. J., LANE, H. Y., LIN, C. H. - **New Treatment Strategies of Depression: Based on Mechanisms Related to Neuroplasticity.** *Neural Plast.* (2017) 4605971.
- ITO, C., TOMIOKA, K. - **Heterogeneity of the Peripheral Circadian Systems in *Drosophila melanogaster*: A Review.** *Front Physiol.* 7. (2016) 8.
- JAGANNATH, A., TAYLOR, L., WAKAF, Z., VASUDEVAN, S. R., FOSTER, R. G. - **The genetics of circadian rhythms, sleep and health.** *Hum Mol Genet.* 26. R2 (2017) R128-R138.
- JIANG, H. Y., QIAO, F., XU, X. F., YANG, Y., BAI, Y., JIANG, L. L. - **Meta-analysis confirms a functional polymorphism (5-HTTLPR) in the serotonin transporter gene conferring risk of bipolar disorder in European populations.** *Neurosci Lett.* 549. (2013) 191-6.
- JOHANSSON, C., WILLEIT, M., SMEDH, C., EKHOLM, J., PAUNIO, T., KIESEPPA, T., LICHTERMANN, D., PRASCHAK-RIEDER, N., NEUMEISTER, A., NILSSON, L. G., KASPER, S., PELTONEN, L., ADOLFSSON, R., SCHALLING, M., PARTONEN, T. - **Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference.** *Neuropsychopharmacology.* 28. 4 (2003) 734-9.
- KAPPELMANN, N., LEWIS, G., DANTZER, R., JONES, P. B., KHANDAKER, G. M. - **Antidepressant activity of anti-cytokine treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials of chronic inflammatory conditions.** *Mol Psychiatry.* 23. 2 (2018) 335-343.
- KATZ, G., KNOBLER, H. Y., LAIBEL, Z., STRAUSS, Z., DURST, R. - **Time zone change and major psychiatric morbidity: The results of a 6-year study in Jerusalem.** *Comprehensive Psychiatry.* 43. 1 (2002) 37-40.
- KAUTTO, M., KAMPMAN, O., MONONEN, N., LEHTIMAKI, T., HARALDSSON, S., KOIVISTO, P. A., LEINONEN, E. - **Serotonin transporter (5-HTTLPR) and norepinephrine transporter (NET) gene polymorphisms: susceptibility and**

treatment response of electroconvulsive therapy in treatment resistant depression. *Neurosci Lett.* 590. (2015) 116-20.

KENNEDY, S. H., LAM, R. W., MCINTYRE, R. S., TOURJMAN, S. V., BHAT, V., BLIER, P., HASNAIN, M., JOLLANT, F., LEVITT, A. J., MACQUEEN, G. M., MCINERNEY, S. J., MCINTOSH, D., MILEV, R. V., MULLER, D. J., PARIKH, S. V., PEARSON, N. L., RAVINDRAN, A. V., UHER, R., GROUP, CANMAT DEPRESSION WORK - **Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) 2016 Clinical Guidelines for the Management of Adults with Major Depressive Disorder: Section 3. Pharmacological Treatments.** *Can J Psychiatry.* 61. 9 (2016) 540-60.

KHALEGHPOUR, S., MASJEDI, M., AHAD, H., ENAYATE, M., PASHA, G., NADERY, F., AHMADZADE, G. - **Morning and nocturnal serum melatonin rhythm levels in patients with major depressive disorder: an analytical cross-sectional study.** *Sao Paulo Med J.* 130. (3) (2012) 167-72.

KHALIFEH, A. H. - **The effect of chronotherapy on depressive symptoms. Evidence-based practice.** *Saudi Med J.* 38. 5 (2017) 457-464.

KOHLER, C. A., FREITAS, T. H., MAES, M., DE ANDRADE, N. Q., LIU, C. S., FERNANDES, B. S., STUBBS, B., SOLMI, M., VERONESE, N., HERRMANN, N., RAISON, C. L., MILLER, B. J., LANCTOT, K. L., CARVALHO, A. F. - **Peripheral cytokine and chemokine alterations in depression: a meta-analysis of 82 studies.** *Acta Psychiatr Scand.* 135. 5 (2017) 373-387.

KOVANEN, L., DONNER, K., KAUNISTO, M., PARTONEN, T. - **PRKCDBP (CAVIN3) and CRY2 associate with major depressive disorder.** *J Affect Disord.* 207. (2017) 136-140.

KURLANSIK, ST., IBAY, AD. - **Seasonal Affective Disorder.** *Am Fam Physician.* 86. (11) (2012) 1037-41.

LAVEBRATT, C., SJOHOLM, L. K., SORONEN, P., PAUNIO, T., VAWTER, M. P., BUNNEY, W. E., ADOLFSSON, R., FORSELL, Y., WU, J. C., KELSOE, J. R., PARTONEN, T., SCHALLING, M. - **CRY2 is associated with depression.** *PLoS One.* 5. 2 (2010) e9407.

LENER, M. S., KADRIU, B., ZARATE, C. A., JR. - **Ketamine and Beyond: Investigations into the Potential of Glutamatergic Agents to Treat Depression.** *Drugs.* 77. 4 (2017) 381-401.

- LEONARD, B. E. - **Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology?** *Acta Neuropsychiatr.* 30. 1 (2018) 1-16.
- LEWY, A.J., ROUGH, J.N., SONGER, J.B., MISHRA, N., YUHAS, K., EMENS, J.S. - **The phase shift hypothesis for the circadian component of winter depression.** *Dialogues Clin Neurosci.* 9. (3) (2007) 291-300.
- LI, C. T., YANG, K. C., LIN, W. C. - **Glutamatergic Dysfunction and Glutamatergic Compounds for Major Psychiatric Disorders: Evidence From Clinical Neuroimaging Studies.** *Front Psychiatry.* 9. (2018) 767.
- LI, J. Z., BUNNEY, B. G., MENG, F., HAGENAUER, M. H., WALSH, D. M., VAWTER, M. P., EVANS, S. J., CHOUDARY, P. V., CARTAGENA, P., BARCHAS, J. D., SCHATZBERG, A. F., JONES, E. G., MYERS, R. M., WATSON, S. J., JR., AKIL, H., BUNNEY, W. E. - **Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110. 24 (2013) 9950-5.
- LIN, E., KUO, P. H., LIU, Y. L., YU, Y. W., YANG, A. C., TSAI, S. J. - **A Deep Learning Approach for Predicting Antidepressant Response in Major Depression Using Clinical and Genetic Biomarkers.** *Front Psychiatry.* 9. (2018) 290.
- LIN, L., YEE, S. W., KIM, R. B., GIACOMINI, K. M. - **SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities.** *Nat Rev Drug Discov.* 14. 8 (2015) 543-60.
- LIU, B., LIU, J., WANG, M., ZHANG, Y., LI, L. - **From Serotonin to Neuroplasticity: Evolvement of Theories for Major Depressive Disorder.** *Front Cell Neurosci.* 11. (2017a) 305.
- LIU, Y. Z., WANG, Y. X., JIANG, C. L. - **Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases.** *Front Hum Neurosci.* 11. (2017b) 316.
- LOGAN, R. W., MCCLUNG, C. A. - **Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan.** *Nat Rev Neurosci.* 20. 1 (2019) 49-65.
- LOWREY, P. L., TAKAHASHI, J. S. - **Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms.** *Adv Genet.* 74. (2011) 175-230.
- MALHI, GIN S., MANN, J. JOHN - **Depression.** *The Lancet.* 392. 10161 (2018) 2299-2312.
- MATTIS, J., SEHGAL, A. - **Circadian Rhythms, Sleep, and Disorders of Aging.** *Trends Endocrinol Metab.* 27. 4 (2016) 192-203.

- MELHUIH BEAUPRE, L., BROWN, G. M., KENNEDY, J. L. - **Circadian genes in major depressive disorder.** World J Biol Psychiatry. (2018) 1-11.
- MOHAWK, J. A., GREEN, C. B., TAKAHASHI, J. S. - **Central and peripheral circadian clocks in mammals.** Annu Rev Neurosci. 35. (2012) 445-62.
- MOORE, RY. - **CIRCADIAN RHYTHMS: Basic Neurobiology and Clinical Applications.** Annu. Rev. Med. 48. (1997) 253-66.
- MORRIS, M. E., RODRIGUEZ-CRUZ, V., FELMLEE, M. A. - **SLC and ABC Transporters: Expression, Localization, and Species Differences at the Blood-Brain and the Blood-Cerebrospinal Fluid Barriers.** AAPS J. 19. 5 (2017) 1317-1331.
- MULINARI, S. - **Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research.** J Hist Neurosci. 21. 4 (2012) 366-92.
- MURROUGH, J. W., ABDALLAH, C. G., MATHEW, S. J. - **Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects.** Nat Rev Drug Discov. 16. 7 (2017) 472-486.
- NUTT, D., WILSON, S., PATERSON, L. - **Sleep disorders as core symptoms of depression.** Dialogues Clin Neurosci. 10. (3) (2008) 329–336.
- O'BRIEN, F. E., DINAN, T. G., GRIFFIN, B. T., CRYAN, J. F. - **Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood-brain barrier: clinical significance of in vitro and in vivo findings.** Br J Pharmacol. 165. 2 (2012) 289-312.
- PALAGINI, L., BAGLIONI, C., CIAPPARELLI, A., GEMIGNANI, A., RIEMANN, D. - **REM sleep dysregulation in depression: state of the art.** Sleep Med Rev. 17. 5 (2013) 377-90.
- PALUCHA-PONIEWIERA, A. - **The role of glutamatergic modulation in the mechanism of action of ketamine, a prototype rapid-acting antidepressant drug.** Pharmacol Rep. 70. 5 (2018) 837-846.
- PAN, YIJUN, NICOLAZZO, JOSEPH A. - **Impact of aging, Alzheimer's disease and Parkinson's disease on the blood-brain barrier transport of therapeutics.** Advanced Drug Delivery Reviews. 135. (2018) 62-74.
- PANDI-PERUMAL, S. R., SMITS, M., SPENCE, W., SRINIVASAN, V., CARDINALI, D. P., LOWE, A. D., KAYUMOV, L. - **Dim light melatonin onset (DLMO): a tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 31. 1 (2007) 1-11.

PARIKH, S. V., QUILTY, L. C., RAVITZ, P., ROSENBLUTH, M., PAVLOVA, B., GRIGORIADIS, S., VELYVIS, V., KENNEDY, S. H., LAM, R. W., MACQUEEN, G. M., MILEV, R. V., RAVINDRAN, A. V., UHER, R., GROUP, CANMAT DEPRESSION WORK - **Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) 2016 Clinical Guidelines for the Management of Adults with Major Depressive Disorder: Section 2. Psychological Treatments.** Can J Psychiatry. 61. 9 (2016) 524-39.

PARTONEN, T., TREUTLEIN, J., ALPMAN, A., FRANK, J., JOHANSSON, C., DEPNER, M., ARON, L., RIETSCHER, M., WELLEK, S., SORONEN, P., PAUNIO, T., KOCH, A., CHEN, P., LATHROP, M., ADOLFSSON, R., PERSSON, M. L., KASPER, S., SCHALLING, M., PELTONEN, L., SCHUMANN, G. - **Three circadian clock genes Per2, Arntl, and Npas2 contribute to winter depression.** Ann Med. 39. 3 (2007) 229-38.

PEVET, P., CHALLET, E. - **Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network.** J Physiol Paris. 105. 4-6 (2011) 170-82.

PHILLIPS, C. - **Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection.** Neural Plast. (2017) 7260130.

PYTKA, K., DZIUBINA, A., MLYNIEC, K., DZIEDZICZAK, A., ZMUDZKA, E., FURGALA, A., OLCZYK, A., SAPA, J., FILIPEK, B. - **The role of glutamatergic, GABA-ergic, and cholinergic receptors in depression and antidepressant-like effect.** Pharmacol Rep. 68. 2 (2016) 443-50.

QOSA, H., MILLER, D. S., PASINELLI, P., TROTTI, D. - **Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders.** Brain Res. 1628. Pt B (2015) 298-316.

RAISON, C. L., CAPURON, L., MILLER, A. H. - **Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression.** Trends Immunol. 27. 1 (2006) 24-31.

REPPERT, SM., WEAVER, DR. - **Coordination of circadian timing in mammals.** Nature. 418. (6901) (2002) 935-41.

RESZKA, E., PEPLONSKA, B., WIECZOREK, E., SOBALA, W., BUKOWSKA, A., GROMADZINSKA, J., LIE, J. A., KJUUS, H., WASOWICZ, W. - **Rotating night shift work and polymorphism of genes important for the regulation of circadian rhythm.** Scand J Work Environ Health. 39. 2 (2013) 178-86.

REUS, G. Z., ABELAIRA, H. M., TUON, T., TITUS, S. E., IGNACIO, Z. M., RODRIGUES, A. L., QUEVEDO, J. - **Glutamatergic NMDA Receptor as Therapeutic Target for Depression.** *Adv Protein Chem Struct Biol.* 103. (2016) 169-202.

RIVES, M. L., JAVITCH, J. A., WICKENDEN, A. D. - **Potentiating SLC transporter activity: Emerging drug discovery opportunities.** *Biochem Pharmacol.* 135. (2017) 1-11.

SATTAR, Y., WILSON, J., KHAN, A. M., ADNAN, M., AZZOPARDI LARIOS, D., SHRESTHA, S., RAHMAN, Q., MANSURI, Z., HASSAN, A., PATEL, N. B., TARIQ, N., LATCHANA, S., LOPEZ PANTOJA, S. C., VARGAS, S., SHAIKH, N. A., SYED, F., MITTAL, D., RUMESA, F. - **A Review of the Mechanism of Antagonism of N-methyl-D-aspartate Receptor by Ketamine in Treatment-resistant Depression.** *Cureus.* 10. 5 (2018) e2652.

SHADRINA, M., BONDARENKO, E. A., SLOMINSKY, P. A. - **Genetics Factors in Major Depression Disease.** *Front Psychiatry.* 9. (2018) 334.

SHAFFERY, J., HOFFMANN, R., ARMITAGE, R. - **The neurobiology of depression: perspectives from animal and human sleep studies.** *Neuroscientist.* 9. 1 (2003) 82-98.

SHI, S. Q., WHITE, M. J., BORSETTI, H. M., PENDERGAST, J. S., HIDA, A., CIARLEGLIO, C. M., DE VERTEUIL, P. A., CADAR, A. G., CALA, C., MCMAHON, D. G., SHELTON, R. C., WILLIAMS, S. M., JOHNSON, C. H. - **Molecular analyses of circadian gene variants reveal sex-dependent links between depression and clocks.** *Transl Psychiatry.* 6. (2016) e748.

SINGH, A. B. - **Improved Antidepressant Remission in Major Depression via a Pharmacokinetic Pathway Polygene Pharmacogenetic Report.** *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 13. 2 (2015) 150-6.

SLAVICH, G. M., IRWIN, M. R. - **From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression.** *Psychol Bull.* 140. 3 (2014) 774-815.

SORIA, V., MARTINEZ-AMOROS, E., ESCARAMIS, G., VALERO, J., PEREZ-EGEA, R., GARCIA, C., GUTIERREZ-ZOTES, A., PUIGDEMONT, D., BAYES, M., CRESPO, J. M., MARTORELL, L., VILELLA, E., LABAD, A., VALLEJO, J., PEREZ, V., MENCHON, J. M., ESTIVILL, X., GRATACOS, M., URRETAVIZCAYA, M. - **Differential association of circadian genes with mood disorders: CRY1 and NPAS2 are associated with**

unipolar major depression and CLOCK and VIP with bipolar disorder. Neuropsychopharmacology. 35. 6 (2010) 1279-89.

STEIGER, A., PAWLOWSKI, M. - **Depression and Sleep.** Int J Mol Sci. 20. 3 (2019).

SWANSON, L. M., BURGESS, H. J., HUNTLEY, E. D., BERTRAM, H., MOONEY, A., ZOLLARS, J., DOPP, R., HOFFMANN, R., ARMITAGE, R., TODD ARNETT, J. - **Relationships between circadian measures, depression, and response to antidepressant treatment: A preliminary investigation.** Psychiatry Res. 252. (2017) 262-269.

TANIYAMA, YUKARI, YAMAUCHI, TAKENORI, TAKEUCHI, SHOUHEI, KURODA, YOSHIKI - **PER1 polymorphism associated with shift work disorder.** Sleep and Biological Rhythms. 13. 4 (2015) 342-347.

TSAI, S. J. - **Critical Issues in BDNF Val66Met Genetic Studies of Neuropsychiatric Disorders.** Front Mol Neurosci. 11. (2018) 156.

UHR, M., TONTSCH, A., NAMENDORF, C., RIPKE, S., LUCAE, S., ISING, M., DOSE, T., EBINGER, M., ROSENHAGEN, M., KOHLI, M., KLOIBER, S., SALYAKINA, D., BETTECKEN, T., SPECHT, M., PUTZ, B., BINDER, E. B., MULLER-MYHSOK, B., HOLSBOER, F. - **Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression.** Neuron. 57. 2 (2008) 203-9.

UTGE, S. J., SORONEN, P., LOUKOLA, A., KRONHOLM, E., OLLILA, H. M., PIRKOLA, S., PORKKA-HEISKANEN, T., PARTONEN, T., PAUNIO, T. - **Systematic analysis of circadian genes in a population-based sample reveals association of TIMELESS with depression and sleep disturbance.** PLoS One. 5. 2 (2010) e9259.

VANCOVA, Z., CIZMARIKOVA, M., DRAGASEK, J., ZOFCAKOVA, S., KOLARCIK, P., MOJZIS, J. - **Does G2677T Polymorphism of the MDRI Gene Make a Difference in the Therapeutic Response to Paroxetine in Depressed Patients in a Slovakian Population?** Med Sci Monit. 24. (2018) 3136-3145.

VARINTHRA, P., LIU, I. Y. - **Molecular basis for the association between depression and circadian rhythm.** Ci Ji Yi Xue Za Zhi. 31. 2 (2019) 67-72.

VASILIOU, V., VASILIOU, K., DW., NEBERT - **Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family.** HUMAN GENOMICS. 3. 3 (2009) 281-290.

WANG, YQ, LI, R., ZHANG, MQ., ZHANG, Z., QU, WM., HUANG, ZL. - **The Neurobiological Mechanisms and Treatments of REM Sleep Disturbances in Depression.** Current Neuropharmacology. 13. (2015) 543-553.

WEAVER, D. R. - **The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective.** J Biol Rhythms. 13. 2 (1998) 100-12.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Depression 2018.** [Accessed on the 7th of January, 2019]. Available in the Internet: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>

WILKENS, S. - **Structure and mechanism of ABC transporters.** F1000Prime Rep. 7. (2015) 14.

WOHLEB, E. S., DELPECH, J. C. - **Dynamic cross-talk between microglia and peripheral monocytes underlies stress-induced neuroinflammation and behavioral consequences.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 79. Pt A (2017) 40-48.

XU, C., LI, CY., KONG, AN. - **Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics.** Arch Pharm Res. 28. (3) (2005) 249-268.

ZAKI, N. F. W., SPENCE, D. W., BAHAMMAM, A. S., PANDI-PERUMAL, S. R., CARDINALI, D. P., BROWN, G. M. - **Chronobiological theories of mood disorder.** Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 268. 2 (2018) 107-118.

ZHANG, J., YAO, W., HASHIMOTO, K. - **Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets.** Current Neuropharmacology. 14. (2016a) 721-731.

ZHANG, L., HIRANO, A., HSU, P. K., JONES, C. R., SAKAI, N., OKURO, M., MCMAHON, T., YAMAZAKI, M., XU, Y., SAIGOH, N., SAIGOH, K., LIN, S. T., KAASIK, K., NISHINO, S., PTACEK, L. J., FU, Y. H. - **A PERIOD3 variant causes a circadian phenotype and is associated with a seasonal mood trait.** Proc Natl Acad Sci U S A. 113. 11 (2016b) e1536-44.