

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos de antidepressivos sobre a expressão gênica global do
hipocampo de ratos submetidos ao modelo do nado forçado:
possível envolvimento do estresse oxidativo**

FREDERICO ROGÉRIO FERREIRA

**Ribeirão Preto
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeitos de antidepressivos sobre a expressão gênica global do hipocampo de
ratos submetidos ao modelo do nado forçado: possível envolvimento do
estresse oxidativo**

FREDERICO ROGÉRIO FERREIRA

Tese de Doutorado apresentado à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto

FERREIRA, Frederico Rogério

Efeitos de antidepressivos sobre a expressão gênica global do hipocampo de ratos submetidos ao modelo do nado forçado: possível envolvimento do estresse oxidativo/ Frederico Rogério Ferreira; Orientador: Francisco Silveira Guimarães – Ribeirão Preto, 2009.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade Federal de São Paulo.

1. Depressão; 2. Hipocampo; 3. Expressão gênica; 4. Expressão protéica;
5. Neurobiologia molecular; 6. Estresse oxidativo; 7. Óxido nítrico.

DEDICATÓRIA

Dedicatória

***aos que encontraram nos limites do conhecimento
uma motivação, a razão e a reflexão.***

Dedico este trabalho

aos meus Pais Joaquim e Marly,
e aos meus irmãos Fabian, Fabrício e Tatiana,
por representarem minha referência e meu porto.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais

Agradeço a Deus, que está acima a todas as coisas.

Ao Dr. Francisco Silveira Guimarães, por confiar e dedicar todo apoio ao projeto. Obrigado pela oportunidade de trabalho no seu laboratório, além das valiosas discussões e ensinamentos, aulas de música erudita, e de como educar o paladar para um bom vinho.

Aos colaboradores Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior e Dr. Joel Lewis Greene, sem os quais seria impossível a realização deste estudo. Nosso especial agradecimento a todos os membros de seus grupos. Mas não podemos esquecer-nos dos nomes da Ane Marry e Alana Catalan, as quais dedicaram maior tempo e esforço neste trabalho.

A Dra Sâmia Regiane Lourenço Joca, por possibilitar valiosos ensinamentos na área de Farmacologia comportamental e valiosas contribuições desde os primeiros passos deste projeto.

Ao Dr. Emmanuel Dias-Neto, pela oportunidade de adquirir os procedimentos relacionados à metodologia SAGE, o qual foi de fundamental importância na execução deste projeto.

À Eleni Tamburus Gomes e ao José Carlos de Aguiar por fazer de seu trabalho um importante auxílio e apoio aos nossos trabalhos.

Ao apoio da secretaria realizado pela Sônia, Fátima e Ramon por todo auxílios e soluções das questões administrativas.

Meu mais sincero e especial agradecimento a todos os colegas e colaboradores do grupo do Prof. Guimarães, os quais compuseram um excelente ambiente de trabalho.

Ainda, mais que amigos, eternos companheiros, agradeço especialmente à Alline, Vanessa, Adrielle e Inácio por fazerem dos momentos de trabalho, às vezes festa, e as festas ainda melhores.

Ao amigo e Palmeirence Djalma, pelo grande companheirismo nesta importante fase de formação profissional.

Agradecemos ainda as agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio financeiro dedicado ao projeto.

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	18
<i>1.1. Etiologia do distúrbio depressivo</i>	19
<i>1.1.1. Fatores hereditários ligados a depressão</i>	19
<i>1.1.2. Neuroanatomia da Depressão</i>	20
<i>1.1.3. Neuroendocrinologia da Depressão</i>	22
<i>1.1.4. Neurogênese, neuroplasticidade e Depressão</i>	24
<i>1.1.5. Neurotransmissores e Depressão</i>	27
<i>1.1.5.1. Monoaminas (Noradrenalina, Serotonina e Dopamina</i>	27
<i>1.1.5.2. Glutamato</i>	29
<i>1.1.5.3. Neurotransmissores atípico</i>	32
<i>1.1.5.3.1. Óxido Nítrico</i>	32
<i>1.1.5.3.2. Canabinóides</i>	34
<i>1.1.6. Estresse oxidativo</i>	35
<i>1.1.7. Mediadores imunológicos e depressão</i>	36
<i>1.1.8. Fatores epigenéticos</i>	38
2. OBJETIVO GERAL	40
<i>2.1. Objetivos específicos</i>	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
<i>3.1. Animais</i>	42
<i>3.2. Grupos de experimentais e drogas</i>	42

3.3. O teste do nado forçado	43
3.4. Análises moleculares	44
3.4.1. Extração de RNA total e análise SAGE	44
3.4.2. Extração de proteínas total e análise por MS/MS espectrometria de massa	45
3.5. Efeito da N-acetil-L-cisteína sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado	46
3.6. Analise dos dados	47
4. RESULTADOS	49
4.1. Efeitos comportamentais da imipramina e 7NI	49
4.2. Resultados obtidos para as analises moleculares	51
4.2.1. Analise do padrão de expressão gênica global por meio da tecnologia SAGE	51
4.2.1.1. Análise da cobertura do transcriptoma por seqüenciamento de tags SAGE	51
4.2.1.2 Análise de Agrupamento Hierárquico	53
4.2.1.3. Análise da expressão gênica diferencial por estratégia SAGE	55
4.2.1.4. Analise de enriquecimento pelo MetaCore	57
4.3. Resultados obtidos para a biblioteca proteômica	90
4.4. Efeito do N-acetil-L-cisteína em animais submetidos ao teste do nado forçado	101
5. DISCUSSÃO	103
6. CONCLUSÃO	118
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8. ANEXOS	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do tratamenco intraperitoneal com veículo (DMSO:salina, 1:1, 1 ml/Kg), 7-Nitroindazole (7-NI, 60 mg/Kg) ou imipramina (15 mg/Kg) por 14 dias sobre a imobilidade (A) e latência (B) de animais submetidos ao teste do nado forçado.	50
Figura 2. Curva de subtração de tags em biblioteca SAGE.	52
Figura 3. Cladograma de análise de agrupamento hierárquico.	54
Figura 4. Taxa de alteração da expressão gênica em <i>fold change</i> para as bibliotecas SAGE dos grupos VEH + NAI, 7NI + FST e FST + IMI em relação ao grupo VEH + FST.	56
Figura 5. Genes envolvidos com o processo fisiológico de Fosforilação oxidativa segundo banco de dados GeneGo.	58
Figura 6. Genes envolvidos no processo fisiológico de Apoptose e/ou proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A segundo banco de dados GeneGo.	61
Figura 7. Genes envolvidos com o processo fisiológico de Remodelagem de citoesqueleto (A) e de Neurofilamentos (B) segundo banco de dados GeneGo.	64
Figura 8. Genes envolvidos com o processo fisiológico de Fosforilação oxidative segundo banco de dados GeneGo.	68
Figura 9. Genes envolvidos com o processo fisiológico de remodelagem de citoesqueleto sinalizado por FAK segundo banco de dados GeneGo.	72
Figura 10. Genes envolvidos com o processo fisiológico ligados a transcrição induzida pela via CREB (A) Fatores de transcrição associados a receptores beta adrenérgicos (B) segundo banco de dados GeneGo.	74
Figura 11. Genes envolvidos com o processo fisiológico de Fosforilação oxidativa segundo banco de dados GeneGo.	77
Figura 12. Genes envolvidos com o processo fisiológico de apoptose-proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A segundo banco de dados GeneGo.	80
Figura 13. Genes envolvidos com o processo fisiológico de remodelagem de citoesqueleto segundo banco de dados GeneGo.	83

Figura 14. Genes envolvidos com o processo fisiológico de controle da transcrição gênica por proteínas de heterocromatina 1 (HP1) segundo banco de dados GeneGo.	84
Figura 15. Genes envolvidos com os processos neurofisiológicos ligados a sinalização de receptor 5-HT1A segundo banco de dados GeneGo.	87
Figura 16. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com veículo	90
Figura 17. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com 7NI	91
Figura 18. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com veículo e avaliados no modelo comportamental do nado forçado.	92
Figura 19. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com 7-NI e avaliados no modelo comportamental do nado forçado.	93
Figura 20. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com imipramina e avaliados no modelo comportamental do nado forçado.	94
Figura 21. Efeito do tratamento intraperitoneal com veículo (salina, 2 ml/Kg), imipramina (15 mg/Kg) ou N-acetil-L-cisteína (NAC 5, 15, 50, 150 e 250 mg/Kg) no tempo de imobilidade no teste do nado forçado (N = 4-8/grupo) e distância percorrida pelo teste do campo aberto (N = 5-8/grupo) em ratos.	102

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Processos biológicos modulados segundo análise de enriquecimento pelo método MetaCore, para os genes diferencialmente expressos entre os grupos VEH+NAI e VEH+FST. **57**
- Tabela 2:** Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH + FST e VEH + NAI para os processos fisiológicos ligados ao fosforilação oxidativa, segundo classificação GeneGo. **59**
- Tabela 3:** Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH+FST e VEH+NAI para os processos fisiológico relacionados à apoptose e/ou proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A, segundo classificação GeneGo. **62**
- Tabela 4:** Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH + FST e VEH + NAI para os processos fisiológicos ligados Remodelagem de citoesqueleto e de neurofilamentos, segundo classificação GeneGo. **65**
- Tabela 5:** Processos biológicos modulados segundo análise de enriquecimento pelo método MetaCore, para os genes diferencialmente expressos entre os grupos VEH + FST e 7NI + FST. **66**
- Tabela 6:** Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH + FST e 7NI + FST para os processos fisiológico ligados a Fosforilação oxidativa, segundo classificação GeneGo. **69**
- Tabela 7:** Genes diferentemente expressos entre os grupos 7NI + FST e VEH + FST para os processos fisiológicos ligados à Remodelagem de citoesqueleto sinalizada por FKA e de Adesão celular, segundo classificação GeneGo. **71**
- Tabela 8:** Genes diferentemente expressos entre os grupos 7NI + FST e VEH + FST para os processos fisiológicos ligados às vias sinalizadas por proteína CREB e vias sinalizadas por receptores beta adrenérgicos, segundo classificação GeneGo. **75**
- Tabela 9:** Processos biológicos modulados segundo análise de enriquecimento pelo método MetaCore, para os genes diferencialmente expressos entre os grupos VEH+FST e IMI+FST. **76**

Tabela 10: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH + FST e IMI + FST para os processos fisiológico ligados a Fosforilação oxidativa, segundo classificação GeneGo.	78
Tabela 11: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH+FST e IMI+FST para os processos fisiológico ligados à apoptose e proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A, segundo classificação GeneGo.	81
Tabela 12: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH+FST e IMI+FST para os processos fisiológico de remodelagem de citoesqueleto e controle da transcrição gênica por proteínas de heterocromatina 1 (HP1), segundo classificação GeneGo.	85
Tabela 13: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH+FST e IMI+FST para os processos neurofisiológicos ligados à sinalização por receptor 5-HT1A, segundo classificação GeneGo.	88
Tabela 14: Processos biológicos modulados segundo análise de enriquecimento pelo método MetaCore para os genes diferencialmente expressos entre os grupos VEH + NAI e 7NI + NAI.	89
Tabela 15: Proteínas diferentemente expressas entre os grupos VEH + FST e VEH + NAI.	96
Tabela 16: Proteínas diferentemente expressas entre os grupos VEH + FST e 7NI + FST.	97
Tabela 17: Proteínas diferentemente expressas entre os grupos VEH + FST e VEH + IMI.	99

LISTA DE ABREVIACÕES

MDD	Transtorno depressivo maior
NO	Óxido nítrico
FST	Modelo do nado forçado
7NI	7-Nitroindazole
NAC	N-acetil-L-cisteína
i.p.	Intra peritonial
DMSO	Dimetilsulfóxido
SAGE	Análise Seriada de Genes Expressos
FH	Formação hipocampal
GC	Glicocorticóides
LTC	Córtex pré-frontal orbital e medial
OMPFC	Córtex pré-frontal órbito-medial
CPF	Córtex pré-frontal
PFCdl	Córtex pré-frontal regiões dorsolateral
PFCvm	Córtex pré-frontal ventromedial
AVP	Vasopressina
CRF	Adrenocorticotropina
HPA	hipófise-pituitária-adrenal
CREB	Elemento ligador de proteína ligada ao AMPc
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
trkB	Receptor tirosina quinase B
6-OHDA	6-hidroxidopamina
TCA	Antidepressivos tricíclicos
SSRIs	Inibidores seletivos de receptação de serotonina
MAOi	Inibidores da monoamina oxidase
SNC	Sistema nervoso central
NMDA	N-metil-D-aspartato
AP-7	Amino-7-fosfonoheptanoic
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionoico
sGC	Guanilato ciclase solúvel
PKC	Proteína quinase II
CB1R	Receptores canabinóides 1
CB2R	Receptores canabinóides 2
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transiente
2-AG	2-aracdonilglicerol
FAAH	Hidrolase de ácidos graxos
MGL	Lípase monoacilglicerol
GSH	L- γ -glutamil-cisteinil-clicine
NF-κB	Fator nuclear kappa
MS	Mascot score
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
FAK	Proteína quinase de adesão focal

RESUMO

Aproximadamente 30% dos pacientes que sofrem de transtorno depressivo maior (MDD) não respondem aos atuais tratamentos farmacológicos. Além disso, 40% a 60% dos pacientes responsivos apresentam recorrência de sintomas com 4-6 meses após o término do tratamento medicamentoso. Assim, a investigação dos mecanismos moleculares responsáveis pelo MDD e o desenvolvimento de novas terapias ainda são necessários. A administração sistêmica ou intra-hipocampal de inibidor da sintase neuronal de óxido nítrico (NO) reduz a imobilidade em roedores submetidos ao modelo do nado forçado (FST), um modelo animal preditivo para atividade antidepressiva.

Objetivos: O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do tratamento crônico com 7-nitroindazole (7NI), um inibidor da sintase neuronal de NO, ou imipramina, um prototípico antidepressivo, sobre a expressão gênica e protéica no hipocampo de ratos Wistar submetidos ao FST. Um experimento adicional foi realizado com o objetivo de investigar a hipótese de que os efeitos terapêuticos dos antidepressivos estão relacionados a mecanismos antioxidantes. N-acetil-L-cisteína (NAC), a cisteína pró-droga com potente efeito antioxidante, foi testada no modelo do FST.

Métodos: Os animais receberam diariamente injeções i.p. de 7NI (60 mg/kg), imipramina (15mg/kg) ou veículo (DMSO:salina 1:1) por 14 dias. O FST foi realizado 1h após a última injeção. Dois grupos controles adicionais receberam veículo ou 7NI, mas não foram submetidos ao FST. Duas horas depois do FST foram obtidos extratos totais de RNAm/proteína do hipocampo para análise seriada de genes expressos (SAGE) e análise proteômica. Em experimento adicional ratos Wistar (n=4-7/grupo) foram submetidos a 15 min de nado forçado, e receberam injeções i.p. de NAC (5, 15, 50, 150 e 250 mg/kg) ou salina, imediatamente após, 5 h depois, e 1 h antes da sessão teste. Durante os 5 min de teste a imobilidade foi registrada. Grupos independentes de animais (n=5-7/grupo) receberam o mesmo tratamento e sua atividade exploratória no campo aberto foi avaliada por 5 min.

Resultados: A partir do seqüenciamento de 60.471, 61.390 e 60.450 etiquetas de genes entre os grupos tratados com veículo, 7NI ou imipramina e submetidos ao FST, respectivamente, e 61.272 e 62.031 etiquetas de genes para os animais tratados com veículo ou 7NI sem o estresse do FST, foi possível identificar e quantificar a expressão de 26.406, 26.256, 19.270, 19.072 e 24.936

genes no hipocampo dos animais destes grupos, respectivamente. A análise de agrupamento hierárquico, o qual agrupou os animais em estressados e não estressados, sugeriu um efeito predominante do estresse sobre o padrão de expressão gênica hipocampal. A análise de enriquecimento funcional para as bibliotecas proteômicas e genômicas mostrou que houve uma modulação significativa de genes associadas à fosforilação oxidativa (29 genes, $P = 2,68^{-11}$), apoptose e/ou proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A (20 genes, $P = 2,6^{-8}$) e remodelagem de citoesqueleto por sinalização Rho-GTPase e de neurofilamentos (11 genes, $P = 3,45^{-7}$; 11 genes, $P = 7,9^{-7}$), quando comparados o grupo veículo não estressado com o grupo veículo-FST. Importantes genes nestas vias foram modulados como o NADH desidrogenase (NADH), succinato desidrogenase (SBH), citocrome c oxidase (COX), ATP sintase (ATP), e genes envolvidos com as vias $G_{(i)}$ PKB-N- κ B-PARP-1, $G_{(i)}$ JAK2-STAT3 e, $G_{(i)}$ AC-PP2A-Bcl2/BAX, assim como as vias RhoA-LIMK2-Actin, com provável efeito sobre processos ligados a neuroplasticidade e controle apoptótico. A análise de enriquecimento de funções celulares para os genes diferentemente expressos entre o grupo veículo, estressado e os grupos tratados com 7NI ou imipramina e submetidos ao FST indicou que o tratamento farmacológico reverteu parte dos efeitos do estresse comportamental sobre a expressão de genes ligados aos processos de fosforilação oxidativa e remodelagem sináptica, sendo que os efeitos positivos do 7NI sobre processos ligados à neuroplasticidade e reorganização sináptica são governados pela facilitação de vias sinalizadas por calmodulina-CREB (9 genes, $P = 1.247^{-05}$), com a modulação dos genes Calmodulina, PP2A e canal de cálcio tipo II, enquanto a imipramina atua preferencialmente sobre genes ligados ao controle de transcrição gênica por heterocromatina (11 genes, $P = 5,25^{-6}$), modulando a expressão de genes como histona deacetilase classe II e histonas H. No teste comportamental o NAC (nas doses de 15, 50, e 150 mg/kg) e imipramina reduziram significativamente [$F_{(6,35)}=6,86$; $P<0,001$; Duncan post-hoc teste $P<0,05$] o tempo de imobilidade sem interferir na atividade exploratória medida no campo aberto.

Conclusão: O efeito tipo antidepressivo das drogas 7NI e imipramina pode estar associado à modulação de grupos importantes de genes hipocampais que atuam na redução dos efeitos do estresse comportamental, incluindo genes relacionados a estresse oxidativo e/ou metabólico bem como aqueles envolvidos em mecanismos neuroplásticos e neuroestruturais nessa estrutura. O efeito do tipo antidepressivo do NAC corrobora esta hipótese.

ABSTRACT

Approximately 30% of patients with major depression (MDD) fail to respond to pharmacological treatment. Moreover, 40-60% of antidepressant responders relapse within 4-6 months after stopping the medication. Therefore, the investigation of the molecular mechanisms responsible for MDD and development of new therapeutic strategies based on these mechanisms are still necessary. Systemic or intra-hippocampal administration of nitric oxide synthase inhibitors decrease immobility time in rodents submitted to the forced swimming test (FST), an animal model predictive of antidepressant activity.

Objective: The aim of this study was to investigate the effects of chronic treatment with 7-nitroindazole (7NI), a neuronal NOS inhibitor, or imipramine, a prototype antidepressant, on protein and gene expression in the hippocampus of rats submitted to the FST. An additional experiment was performed aimed at investigating the hypothesis that the therapeutic effects of antidepressant drugs are related to antioxidant mechanisms. N-acetyl-L-cysteine, a cysteine prodrug with powerful antioxidant activity, was tested on the FST model.

Methods: Male Wistar rats received daily i.p. injections of 7NI (60 mg/kg), imipramine (15mg/kg) or vehicle for 14 days. FST was performed 1h after the last injection. Two additional control groups received vehicle or 7NI but were not submitted to the FST. Two hours after the FST total hippocampal mRNA/protein was extracted for serial analysis of gene expression (SAGE) and proteomic analysis. In the additional experiment male Wistar rats (n=4-7/group) were subjected to 15 min of forced swimming and immediately afterwards, 5, and 23 h later received i.p. injections of NAC (5, 15, 50, 150, and 250 mg/kg), imipramine, (15 mg/kg) or vehicle (saline solution). One hour later they were submitted to the 5 min test swimming session, and immobility time was recorded. Independent groups of animals (n=5-7/group) received the same treatments and their exploratory activity was measured in an open arena for 5 min.

Results: Imipramine and 7NI significantly decreased immobility time (Vehicle: 222.12±17.96s; 7NI: 111.80±60.08s, imipramine: 104.62±25.69, $F_{(2,18)}=15.83$, $P=0.0001$). The sequencing of 60,471; 60,745 and 61,390 gene tags from animals submitted to FST and treated with vehicle, imipramine or 7NI, respectively, and 61,272 and 62,031 gene tags from control groups treated with vehicle or 7NI, respectively, allowed the identification and quantification of 26,406; 26,256; 19,270; 19,072; and 24,936 hippocampal genes of the different experimental groups. Functional

enrichment analyses of the genomic and protein libraries showed that genes associated with oxidative phosphorylation (29 genes, $P = 2,68^{-11}$), apoptosis and proliferation signaling by 5-HT1A (20 genes, $P = 2,6^{-8}$), cytoskeletal remodeling signaling by Rho-GTPase and the neurofilament (11 genes, $P = 3,45^{-7}$; 11 genes, $P = 7,9^{-7}$), were significantly modulated when the group vehicle non-stressed was compared to vehicle-FST. Important genes for these processes such as NADH dehydrogenase (NADH), succinate dehydrogenase (SBH), cytochrome c oxidase (COX), ATP synthase (ATP), and genes enrolled in the pathways $G_{(i)}PKB-N-\kappa B-PARP-1$, $G_{(i)}JAK2-STAT3$ and, $G_{(i)}AC-PP2A-Bcl2/BAX$, as well the pathways RhoA-LIMK2-Actin were modulated whitening that groups. The enrichment analysis of cell functions of the genes differently expressed in the vehicle-stressed group and animals treated with 7NI or imipramine and submitted to FST indicated that the pharmacological treatment reversed part of behavioral stress effects on the expression of genes enrolled in oxidative phosphorylation and synaptic remodeling possibly by facilitating signaling involving the calmodulin-CREB pathway (9 genes, $P = 1.247^{-05}$), including genes for calmodulin, PP2A and type II calcium channel. Imipramine acted preferentially on genes linked to gene transcription control by heterochromatin (11 genes, $P = 5,25^{-6}$), modulating genes such as class II histones deacetylase, and histone H. Moreover, NAC (at the doses of 15, 50, and 150 mg/kg) and imipramine induced a significant ($F_{(6,35)}=6,86$; $P<0,001$; Duncan post-hoc test $P<0,05$) decrease in immobility time without changing exploratory behavior measured in an open arena.

Conclusion: The antidepressant-like effect of 7NI and imipramine may be related to modulation of important hippocampal genes, including those related to oxidative and/or metabolic stress, and also those enrolled in neuroplastic processes in this brain structure. The antidepressant-like effect of NAC corroborates the former proposal.

1. INTRODUÇÃO

O distúrbio emocional do tipo depressivo é definido clinicamente, segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística para Doenças Mentais-IV (1994) da Associação Norte Americana de Psiquiatria, como a ocorrência por período superior a duas semanas dos sintomas de humor deprimido, redução do interesse por atividade que normalmente produziam prazer ou anedonia, freqüentemente acompanhado de distúrbio de apetite e sono, redução da atividade geral, dificuldade de concentração, manter a conversação, tomar decisões e recorrência de pensamentos ou intenção de suicídio. Atualmente estima-se que a depressão é responsável por até 20% das causas de incapacidades, e entre 10-20% da população apresentará o distúrbio em algum momento da vida. Projeções para 2020 indicam que a depressão se tornará a segunda causa de custo social, sendo a primeira entre as doenças psiquiátricas (LOPEZ; MURRAY, 1998). Além dos custos sociais, a depressão aumenta o risco de suicídio. Segundo levantamento realizado nos Estados Unidos da América, aproximadamente 3,4% da população com depressão comete suicídio, e até 60% das pessoas que cometem suicídio sofrem de depressão ou outro distúrbio emocional (ANGST; ANGST; STASSEN, 1999; WAERN et al., 2002). Por estas razões, a Organização Mundial de Saúde classifica esta afecção entre os principais problemas de saúde pública.

Mesmo com a introdução de drogas com efeito antidepressivo por volta da década de 60 e os recentes avanços na farmacoterapia, a remissão dos sintomas é freqüentemente não superior a 50%, e aproximadamente 40-60% dos pacientes que respondem ao tratamento apresentam recorrência da doença após 4 a 6 meses de seu término (HIRSCHFELD, 1999; THASE et al., 2007; PAPAKOSTAS; FAVA; THASE, 2008). Desta forma, as projeções em termos de saúde

pública e as deficiências dos tratamentos sugerem que o controle desta doença ainda está longe de ser alcançado (HOLDEN, 1991). Assim, fica evidente a necessidade do melhor entendimento da neurobiologia deste distúrbio, o que possibilitaria o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.1. Etiologia do distúrbio depressivo

1.1.1. Fatores hereditários ligados à depressão

Apesar da alta prevalência e impacto social da depressão, pouco é conhecido a respeito da neurobiologia deste distúrbio. Desde a década de 70 discute-se o envolvimento de fatores genético (RAINER, 1966). Estudos em grupos familiares mostram que parentes de primeiro grau de pacientes possuem risco até três vezes maior de desenvolver a doença comparada a população (SUSLAK et al., 1976). Além disso, existe uma elevada co-ocorrência destes distúrbios entre gêmeos idênticos, comparado a gêmeos não idênticos, que é de aproximadamente 69% e 13%, respectivamente (SACHAR; BARON, 1979). Um pouco mais recente, (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000), revisão de trabalhos de associação gênica concluiu que pelo menos 31-42% dos fatores que levam ao distúrbio do tipo depressivo estão associados a fatores hereditários (HAMET; TREMBLAY, 2005). Estudos de ligação gênica também têm contribuído para a hipótese genética da depressão. Segundo estes estudos, existira uma associação entre a suscetibilidade à depressão a genes nas regiões cromossômicas 3p12.3-q12.2; 18q21.33-q22.2 (CAMP et al., 2005); 12q22-q23.2 (ABKEVICH et al., 2003) e 15q26-q26 (LEVINSON et al., 2007), além de uma série de regiões identificadas por marcadores de microsatélites (CAMP; CANNON-ALBRIGHT, 2005).

Por fim, um estudo de revisão agrupando 183 trabalhos verificou 393 polimorfismos em 102 genes com potencial de associação com a depressão. Neste estudo, os autores concluíram que pelo menos 5 genes, dentro um universo de 18 genes com 20 polimorfismos, possuiriam correlação estatística com depressão confirmada em outros estudos (LOPEZ-LEON et al., 2008).

A interpretação destes trabalhos sugere uma complexa interação entre um grande número de fatores genéticos com uma relativamente pequena contribuição de cada um. Assim, a depressão seria um distúrbio de etiologia complexa que não resultaria da influência isolada de fatores genético ou ambientais mas sim de ambos (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000).

1.1.2. Neuroanatomia da Depressão

Estudos de neuroimagens, neuropatologia e lesão têm produzido evidências sobre a circuitaria neuroanatômica relacionada ao transtorno depressivo. Nestas conexões estão incluídas as vias límbicas que participam a amígdala, talamos medial, córtex pré-frontal orbital e medial (LTC), e as vias límbico-cortical-estriatal-palidal-talâmico (LCSPT), formada pelas conexões entre o córtex pré-frontal órbito-medial (OMPFC), amígdala, formação hipocampal, estriado ventromedial, núcleos talâmicos e pálido ventral (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001; DREVETS; PRICE; FUREY, 2008; PRICE; DREVETS, 2009).

A amígdala recebe informações sensoriais de diferentes modalidades (olfatória, visceral, somato-sensorial, visual e auditória) (PRICE, 2003) e no sistema límbico é responsável pelo processamento de respostas de fundo emocional ou afetiva (BYRUM; AHEARN; KRISHNAN, 1999). O seu envolvimento na depressão ficou evidente ao ser verificado que pacientes deprimidos apresentam maior atividade desta estrutura (DREVETS et al., 1992),

hipersensibilidade quando apresentadas faces de pessoas em situações negativas (SHELIN et al., 2001), e volume aumentado desta estrutura quando comparado a indivíduos saudáveis (FRODL et al., 2002).

Alterações funcionais e metabólicas também foram registradas em regiões do córtex pré-frontal (CPF). O CPF está localizado na porção anterior do lobo frontal, e representa de 40-50% do volume encefálico, incluindo as regiões dorsolateral (PFCdl) e ventromedial (PFCvm), que também fazem parte do sistema límbico (DREVETS, 1998). Dentre suas funções, o CPF atua em processos cognitivos complexos como planejamento, tomada de decisão e flexibilidade comportamental. Existem evidências mostrando papel distinto entre estas sub-regiões, sendo que a região dorsolateral teria sua atividade suprimida, enquanto a região ventromedial estaria hiper-reativa nos pacientes com depressão (KOENIGS; GRAFMAN, 2009).

Além destas regiões, diversas evidências sugerem o envolvimento da formação hipocampal na fisiopatologia da depressão. A formação hipocampal (FH) é uma estrutura bilaminar que se projeta caudalmente às porções rostrais, ocupando a base do corno temporal do ventrículo lateral, e estendendo-se até o esplênio do corpo caloso. Observado em secções coronais, pode ser dividido nas regiões denominadas CA1-CA4, com base na morfologia dos neurônios piramidais e suscetibilidade à anóxia. O córtex entorrinal projeta a maioria das conexões aferentes para formar sinapses tanto com neurônios da região CA1 como com células granulares do giro denteado. Já a formação hipocampal, através do subiculum, envia projeções eferentes para o fórnix e finalmente núcleos anterolaterais. Também existem projetos eferentes para o córtex entorrinal, por onde estas fibras atingem o córtex de associação temporal inferior, o córtex pré-frontal e pólo temporal (CAMPBELL; MACQUEEN, 2004). Existe extensa conexão do hipocampo com a amígdala pela sua região caudal, ou hipocampo ventral nos roedores, que

tem fomentado estudos de sua participação nos distúrbios afetivos, em detrimento do papel a priori descrito para a memória (CAMPBELL; MACQUEEN, 2004; SEMINOWICZ et al., 2004). Evidências clínicas e pré-clínicas têm mostrado que o volume do complexo hipocampal é reduzido entre pacientes com depressão, sugerindo que alterações estruturais deste órgão podem estar relacionadas ao distúrbio depressivo (CAMPBELL et al., 2004; VIDEBECH; RAVNKILDE, 2004).

Por fim, a resposta ao tratamento antidepressivo aparentemente está relacionado à reversão das alterações estruturais e/ou neurofuncionais observadas tanto na amígdala como no córtex pré-frontal e hipocampo (SHELIN, BARCH, DONNELLY et al., 2001; CAMPBELL; MACQUEEN, 2004; DREVETS; PRICE; FUREY, 2008; PRICE; DREVETS, 2009). Em conjunto, estes estudos sugerem que a disfunção na circuitaria límbicotemporal-frontal-caudado estaria implicada na instalação e/ou manutenção do quadro depressivo.

1.1.3. Neuroendocrinologia e Depressão

A aproximação ou experiência de uma ameaça física, psicológico e/ou social capaz de alterar o equilíbrio homeostático, usualmente identificado como estresse (SELYE, 1998), recruta no organismo uma série de alterações fisiológicas e comportamentais que favorecem a adaptação ao novo desafio. Grande parte desta resposta são acionadas pelos “sinalizadores de estresse”, mineralocorticóides e glicocorticóides (GC, cortisol em humanos e corticosterona nos roedores) produzidos pelas glândulas supra-renais. Este sistema é acionado a partir do hipotálamo, ao estimular a pituitária por meio do fator liberador da adrenocorticotropina (CRF) e vasopressina (AVP), que por sua vez produz o hormônio adrenocorticotropina (ACTH), que finalmente

estimula as glândulas adrenais a liberarem os hormônios do estresse, pela via descrita como eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA) (DE KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005; JOCA; FERREIRA; GUIMARAES, 2007; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008). No entanto, a exposição repetida ao estresse, ou ainda exposição a um estresse muito intenso, pode levar a uma resposta desproporcional ou exacerbada prejudicando ainda mais a homeostasia (LUPIEN; MCEWEN, 1997; GUBBA; NETHERTON; HERBERT, 2000). O hipocampo atua neste sistema, juntamente com o córtex pré-frontal, estabelecendo o controle dos níveis destes hormônios por *feedback* negativo, evitando os efeitos deletérios destes sinalizadores (HERMAN et al., 1989; MIZOGUCHI et al., 2003).

Assim, alterações neurofisiológicas no hipocampo e córtex pré-frontal ligadas ao estresse têm sido relacionadas à gênese da depressão, tendo como referências em uma série de evidências como: 1. pacientes com depressão freqüentemente relatam episódios estressantes precedendo as crises (KESSLER, 1997; KENDLER; KARKOWSKI; PRESCOTT, 1999; AGID; KOHN; LERER, 2000); 2. grande parte dos modelos animais de depressão empregam a exposição a estresse ou tratamento crônico com glicocorticóides (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002), sendo que os animais submetidos a estes modelos podem exibir comportamentos análogos aos de paciente com depressão como prejuízo de memória e orientação espacial (KIM; DIAMOND, 2002), distúrbio do sono e alimentar, perda do interesse por estímulos relacionados ao prazer (WILLNER, 1990); 3. pacientes tratados com corticóides ou portadores da síndrome de Cushing podem desenvolver depressão; e 4. pacientes com depressão e animais submetidos a estresse apresentam nível elevado de glicocorticóides circulantes e déficit na supressão do eixo HPA após administração da dexametasona (BROWN; RUSH; MCEWEN, 1999). Tanto no homem como nos modelos animais o tratamento com antidepressivos reverte a maioria das alterações geradas em

consequência da exposição ao estresse ou de glicocorticóides (PARIANTE et al., 2001; AIHARA et al., 2007). É possível, portanto, que o distúrbio depressivo tenha origem em disfunção hipocampal que levaria à incapacidade de manutenção dos níveis normais glicocorticóides pela perda da inibição do eixo HPA (PEETERS; BROEKKAMP, 1994; PARIANTE, MAKOFF, LOVESTONE et al., 2001; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008). No entanto, o fato de que nem todos os indivíduos que tiveram experiências estressantes desenvolvam quadros depressivos sugere que outros fatores possam estar envolvidos no desenvolvimento deste distúrbio.

1.1.4. Neurogênese, neuroplasticidade e depressão

Altman e Das na década de 70 contestaram o “dogma de Ramon y Cajal” ao mostrarem a existência de nascimento de novos neurônios no bulbo olfatório e giro denteado de hipocampo de rato (ALTMAN; DAS, 1965). Eriksson, Gage e colaboradores, mais recentemente, mostraram que este é um fenômeno constitutivo e contínuo ao longo da vida, inclusive para o hipocampo de humanos adultos (ERIKSSON et al., 1998). Estes achados, em conjunto com os estudos clínicos da associação entre o volume hipocampal, estresse e tratamentos antidepressivos, abriram uma nova perspectiva na neurobiologia dos distúrbios neurológicos, e colocou a neurogênese e/ou neuroplasticidade como pano de fundo na origem destes distúrbios (CAMPBELL; MACQUEEN, 2004; SEMINOWICZ, MAYBERG, MCINTOSH et al., 2004; PRICE; DREVETS, 2009).

Células precursoras quiescentes, que existem em todo o cérebro, podem ser ativadas em certos tipos de lesões. Contudo, a neurogênese adulta *per si* é descrita como um fenômeno restrito às regiões subventricular do ventrículo lateral e sub-granular do giro denteado hipocampal. Cerca de 9.000 novas células surgem na lâmina granular hipocampal, mas somente 50-80% migram

para lâmina granular, onde se tornam neurônios maduros, estabelecendo conexões eferentes com o córtex entorrinal e aferentes com a região CA3 (LLEDO; ALONSO; GRUBB, 2006; ZHAO et al., 2006). Apesar do relativo consenso a respeito do papel da neurogênese hipocampal nos processos ligados a aprendizado espacial e memória (SHORS et al., 2001; SNYDER et al., 2005) o seu papel nos distúrbios afetivos ainda é matéria de debate (LLEDO; ALONSO; GRUBB, 2006).

As alterações plásticas e estruturais deste órgão em resposta ao estresse e tratamento com drogas antidepressivas chamou a atenção para a relação entre neurogênese e depressão. Primeiramente foi verificado que a exposição a diferentes estressores suprime a neurogênese, sendo que este efeito é revertido pelo tratamento crônico, e não agudo, com diferentes classes de antidepressivos (MALBERG et al., 2000; DRANOVSKY; HEN, 2006; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006). Curiosamente, o tempo de tratamento necessário para reversão dos efeitos comportamentais e aumento da neurogênese corresponde à latência de 3 a 4 semanas para obtenção do efeito farmacológico em pacientes depressivos. Além disso, drogas antipsicóticas atípicas, que também são efetivas no tratamento da depressão, têm efeito proliferativo, enquanto os antipsicóticos típicos, que são ineficientes contra os sintomas depressivos, não apresentam efeito proliferativo (WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006). Como discutido anteriormente, estes efeitos, no seu conjunto, poderiam explicar a restauração plástica destas estruturas pelo tratamento farmacológico com antidepressivos.

Por outro lado, a partir da relevante descoberta de Bliss e colaboradores (BLISS; LOMO, 1973), verificando o aumento da eficiência sináptica pelo mecanismo descrito como potencialização de longo prazo (LTP), e posteriormente a redução da eficiência pela depressão de longo prazo (LTD), ficou evidente que além de alterações estruturais, alterações funcionais

persistentes poderiam modular as respostas comportamentais. Em modelo animais relacionado ao comportamento tipo depressivo foi verificado que o estresse crônico variado facilita a formação de LTD em fatias de hipocampo, sem modificar a LTP. Contudo, o tratamento com fluoxetina previne o efeito do estresse sobre a LTD e facilita a formação de LTP (HOLDERBACH et al., 2007).

Ainda em consonância com estas evidências, existe um corpo extenso de estudos mostrando que o estresse é capaz de reduzir a ativação por fosforilação do elemento ligador de proteína ligada ao AMPc (CREB) e reduzir a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e seu receptor tirosina quinase B (trkB), com prejuízos sobre a cascata sinalizadora neurotrófica e conseqüente redução da proliferação celular no hipocampo. Por outro lado, o tratamento crônico com antidepressivos aumenta a fosforilação de CREB, expressão de BDNF e trkB, prevenindo as conseqüência plásticas do estresse. Apesar de ainda discutível, tem sido proposto que a ativação desta via (BDNF-trkB-CREB), com conseqüente alterações na plasticidade e neurogênese hipocampal, seria fundamental para o aparecimento dos efeitos benéficos dos antidepressivos (CARLEZON; DUMAN; NESTLER, 2005).

No entanto, boa parte dos resultados experimentais que apóiam esta hipótese é de natureza correlacional (WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006). Em busca de uma relação causal, (SANTARELLI et al., 2003; SURGET et al., 2008) e respectivos colaboradores mostraram que a ablação da neurogênese por irradiação impede o aparecimento de alguns dos benefícios comportamentais atribuídos ao tratamento farmacológico com antidepressivos. Contudo, Bessa e colaboradores (BESSA et al., 2009) mostram, empregando os modelos do desamparo aprendido e anedonia, que a proliferação celular hipocampal não interfere nas respostas comportamentais dos antidepressivos. Estes autores argumentam que é o aumento da arborização sináptica no córtex e

hipocampo que seria relevante. Resultados semelhantes foram descritos por Holick, Huang, Petersén e colaboradores para camundongos da linhagem BALB/cJ e ratos da linhagem *Flinders* (susceptível a depressão). Eles mostraram que o tratamento crônico com fluoxetina ou nortriptilina, respectivamente, promove alterações comportamentais, mas não altera a proliferação celular no hipocampo (HOLICK et al., 2008; HUANG; BANNERMAN; FLINT, 2008; PETERSEN et al., 2009). Por outro lado, Airan e colaboradores, utilizando corante sensível a diferenças de potencial elétrico das células que permite registro da atividade neuronal em secções laminares, mostraram que a atividade hipocampal está aumentada nos animais tratados cronicamente com antidepressivos e submetidos ao teste do nado forçado. Este efeito possivelmente está relacionado a aumento da neurogênese (AIRAN et al., 2007). No conjunto, embora existam resultados contraditórios, diversas evidências sugerem que mecanismos envolvendo neuroplasticidade e/ou neurogênese sejam importantes para a obtenção dos efeitos benéficos do tratamento com antidepressivos sobre o comportamento (CASTREN, 2005).

1.1.5. Neurotransmissores e Depressão

1.1.5.1. Monoaminas (Noradrenalina, Serotonina e Dopamina)

Na década de 60, Selikoff e Robitzek observaram que pacientes tratados com isoniazida e iproniazida, duas novas drogas anti-tuberculose, também apresentavam melhor nos quadros de humor ou produziam euforia (SELIKOFF; ROBITZEK, 1952). Pouco depois, estudos clínicos confirmaram estes efeitos em pacientes sofrendo de depressão (SALZER; LURIE, 1953; SMITH, 1953; SALZER; LURIE, 1955). Quase ao mesmo tempo, foi descrito que a imipramina, um composto desenvolvido a princípio como anti-histamínico, também possuía propriedade de

melhorar o humor (KUHN, 1958). A descrição da atividade inibidora da monoamina oxidase (MAO) da iproniazida, e poucos anos depois, o relato de que a imipramina atuaria como inibidor da recaptação de noradrenalina (AXELROD; WHITBY; HERTTING, 1961), trabalho que conferiu Nobel a Julius Axelrod, fez germinar a hipótese monoaminérgica para os distúrbios de humor. A partir de então, extenso corpo de evidências tem associado as monoaminas aos distúrbios depressivos.

Em apoio a esta hipótese foi verificado que primatas não humanos ou pacientes tratados com reserpina (uma droga que bloqueia a captação da noradrenalina pelas vesículas do botão sináptica o que resulta no esgotamento deste neurotransmissor) com objetivos de obter efeito anti-hipertensivo, apresentavam comportamento semelhante à depressão de forma aguda (MCKINNEY et al., 1971; AKISKAL; MCKINNEY, 1973). Efeito correlato pode ser observado em animais tratados com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma droga que destrói as fibras catecolaminérgicas, mas não atinge os terminais serotoninérgicos (AKISKAL; MCKINNEY, 1973). Além disso, foi verificado que pacientes com dieta privada de triptofano, um precursor obrigatório na síntese de serotonina, apresentam reaparecimento de sintomas ou não respondem ao tratamento com antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina (DELGADO et al., 1994; PRICE et al., 1997; BELL; ABRAMS; NUTT, 2001; RUHE; MASON; SCHENE, 2007). Tomados juntos, estes estudos compõem o corpo de evidências que sustentam a hipótese monoaminérgica para o distúrbio depressivo. Assim, dentro desta proposta, a depressão teria origem no déficit na neurotransmissão monoaminérgica, sendo que os antidepressivos tricíclicos (TCA), inibidores seletivos de receptação de serotonina (SSRIs) ou noradrenalina, e inibidores da monoamina oxidase (MAOi), restaurariam estes sistemas aumentando a disponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica (SCHILDKRAUT, 1965; MANJI; DREVETS;

CHARNEY, 2001; CASTREN, 2005).

Contudo, o fato de indivíduos saudáveis privados de triptofano apresentarem pouca ou nenhuma alteração de humor (NESTLER, 1998; MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001; RUHE; MASON; SCHENE, 2007), bem como a necessidade de tratamento por 3-6 semanas para o efeito terapêutico dos antidepressivos, têm desafiado a hipótese monoaminérgica, pelo menos na sua forma original (NESTLER, 1998).

Evidências obtidas em modelos animais sugerem que a latência no aparecimento dos efeitos comportamentais esteja relacionada à dessensibilização de auto-receptores de serotonina (5-HT) nos neurônios presentes nos núcleos da rafe, enquanto os neurônios pós-sinápticos não são dessensibilizados (PINEYRO; BLIER, 1999).

É importante salientar que as hipóteses monoaminérgicas e neuroplástica não são excludentes, visto que o aumento crônico da disponibilidade das monoaminas promove alterações plásticas em áreas como o hipocampo e córtex pré-frontal (NESTLER, 1998; MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001; PAUL; SKOLNICK, 2003; CASTREN, 2005). Outro fato que tem chamado a atenção é o relativamente rápido e eficaz efeito antidepressivo da tianeptina, uma droga que atua por mecanismos aparentemente independentes das vias monoaminérgicas (ZOLADZ et al., 2008; MCEWEN et al., 2009).

1.1.5.2. Glutamato

Glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso central (SNC), e atua nos terminais pré- e pós-sinápticos ativando receptores caracterizados farmacologicamente em dois grupos. O primeiro deles, receptores ionotrópicos, quanto

estimulado abrem um canal e permitem o fluxo (com diferentes condutâncias dependendo do receptor) de íons sódio, potássio ou cálcio para dentro da célula. Neste grupo estão inclusos os receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) (WEAVER et al.) e família kainato. O segundo grupo, receptores metabotrópicos, são acoplados a proteína G e exercem sua atividade por meio da via de segundo mensageiro. A ativação destes receptores modula uma série de funções como plasticidade e excitabilidade sináptica na maioria dos circuitos cerebrais, incluindo as vias límbicas relacionadas à depressão (PAUL; SKOLNICK, 2003; MATHEW; KEEGAN; SMITH, 2005).

Inicialmente a inibição sistêmica da sinalização por receptores NMDA mostrou-se eficiente como antidepressivo nos testes com modelos animais (TRULLAS; SKOLNICK, 1990; LAYER et al., 1995). Logo em seguida, estudos clínicos confirmaram a melhora rápida e robusta nos quadros de humor em pacientes tratados com ketamina, um antagonista de NMDA (BERMAN et al., 2000; ZARATE et al., 2006). Mais recentemente, o efeito tipo antidepressivo pôde ser reproduzido pela microinjeção de ácido amino-7-fosfonoheptanoic (AP-7), um antagonista glutamatérgico NMDA, no hipocampo de ratos, sugerindo que a sinalização glutamatérgica nesta estrutura participa na modulação das consequências comportamentais ligados ao estresse inescapável (PADOVAN; GUIMARAES, 2004). Além disso, ainda é possível que parte dos efeitos antidepressivos das drogas inibidoras da recaptação de noradrenalina e/ou serotonina seja devido à inibição da atividade de receptores NMDA. Foi verificado que tanto a serotonina (MURASE et al., 1990) como TCA/SSRIs inibem a atividade NMDA seletivamente em concentrações próximo ao terapêutico (REYNOLDS; MILLER, 1988; MAYER; SZASZ; KISS, 2009).

Evidências mostrando que a ativação de receptores não-NMDA por ácido caínico induz a expressão da neurotrofinas com BDNF e NGF, levantou a possibilidade de que a modulação da sinalização glutamatérgica-AMPA poderia ter efeito antidepressivo (ZAFRA et al., 1990). De fato, Li e colaboradores mostraram que o potenciador de receptores AMPA, o LY392098, produz efeito do tipo antidepressivo dose-dependente, semelhante à imipramina (LI et al., 2001). Por fim, foi verificado que o tratamento crônico com antidepressivos aumenta a expressão de receptor AMPA no hipocampo de ratos (MARTINEZ-TURRILLAS; FRECHILLA; DEL RIO, 2002), além de aumentar a fosforilação dos sítio Ser⁸³¹-GluR₁ e Ser⁸⁴⁵-GluR₁ do receptor AMPA em extratos de estriado, córtex e hipocampo (SVENNINGSSON et al., 2002).

Estudos eletrofisiológicos e em modelos animais têm apoiado a proposta de envolvimento da sinalização glutamatérgica mediada por receptores metabotrópicos na depressão. Inicialmente foi verificado um aumento da excitabilidade de neurônios da região hipocampal CA1 mediante estímulo de receptores mGluR do grupo I (DAVIES et al., 1995), sendo que o tratamento crônico, e não agudo, com imipramina ou eletroconvulsoterapia produz um aumento na amplitude dos disparos, isto é, sensibilização, destes neurônios mediante exposição aos agonistas mGluR (PILC et al., 1998). Além disso, estas mesmas manipulações promovem o aumento da expressão dos receptores mGluR₁ e mGluR₅ na formação hipocampal (SMIALOWSKA et al., 2002). Juntos, estes estudos sugerem que as manipulações associadas aos efeitos antidepressivos podem estar sob a influência do aumento da atividade hipocampal por facilitação de receptores mGluR. Em consonância com estes estudos, um corpo extenso de trabalhos tem mostrado que o tratamento crônico com os agonistas de receptores mGluR do grupo I, II ou III têm efeito tipo antidepressivo em diferentes modelos animais (MACHADO-VIEIRA; MANJI; ZARATE, 2009). Estas evidências sugerem o envolvimento da neurosinalização glutamatérgica envolvendo receptores

NMDA, metabotrópicos, especialmente do grupo 1 (mGluR₁ e mGluR₅), e AMPA nos distúrbios depressivos (PAUL; SKOLNICK, 2003; MATHEW; KEEGAN; SMITH, 2005; MACHADO-VIEIRA; MANJI; ZARATE, 2009).

1.1.5.3. Neurotransmissores atípico

1.1.5.3.1. Óxido Nítrico

Desde os experimentos de Garthwaite e colaboradores (1988), mostrando que a estimulação de receptores NMDA de glutamato em preparado de neurônio estimula a produção de óxido nítrico (NO) (GARTHWAITE; CHARLES; CHESS-WILLIAMS, 1988), e pouco depois, os estudos mostrando que os antagonistas de NMDA produziam efeito nos modelos de ansiedade e depressão, ficava evidente que o NO poderia ter envolvimento nos processos cerebrais ligados ao comportamento. Jefferys e Funder (JEFFERYS; FUNDER, 1996) foram os primeiros a testarem essa hipótese. Eles verificaram que a inibição sistêmica da enzima sintase de NO produzia efeito do tipo antidepressivo. Utilizando o 7-nitroindazole (7NI), um inibidor preferencial da NOS neuronal (nNOS), Yildiz (2000), Volke (2003) e seus colaboradores, estenderam estas evidências, sugerindo a inibição da nNOS como possível novo alvo terapêutico para os distúrbios afetivos (YILDIZ et al., 2000; VOLKE et al., 2003).

Atualmente parece claro que a ativação de receptores NMDA resulta no aumento intracelular de íons Ca^{2+} , o qual forma o complexo Ca^{2+} -calmodulina para estimular a conversão da L-arginina em L-citrulina, e liberar o NO pela NOS. O NO é produzido e rapidamente se difunde entre as células, podendo ativar a guanilato ciclase solúvel (sGC) na conversão do guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP), que por fim

resulta na ativação da fosfodiesterase II ou proteína quinase II (PKC), na via mais conhecida como NO-cGC-cGMP (PAUL; SKOLNICK, 2003). Joca e Guimarães (2006) estendem essas evidências ao mostrarem que a administração intra-hipocampal de 7NI reproduz efeito antidepressivo, e sugerem mais uma vez que a sinalização glutamatérgica ligado ao NO possa estar envolvida na neurobiologia da depressão. Por fim, Heiberg e colaboradores (2002) confirmam a participação desta via ao mostrarem que a inibição da sGC resulta nos efeitos do tipo antidepressivos (HEIBERG; WEGENER; ROSENBERG, 2002). Além das evidências comportamentais, foi verificado que a inibição nNOS também aumenta a expressão de neurotrofinas como o BDNF (JOCA et al., 2009 dados não publicados), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (SHIRAYAMA et al., 2002; CASTREN; VOIKAR; RANTAMAKI, 2007; THAKKER-VARIA et al., 2007; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2008), com efeito positivo sobre a neurogênese hipocampal, fato que corrobora à hipótese neurogênica da depressão.

No entanto, tem crescido o corpo de evidências sugerindo que parte dos efeitos fisiológicos do NO não seja dependente de sGC. Além da ligação do NO ao grupo heme presente nesta enzima, a modificação fisiológica da função de proteínas pode ser induzida pela reação de resíduos de cisteína ao NO, formando do S-nitrosotiol, num processo descrito como S-nitrosilação. Atualmente admiti-se que a S-nitrosilação/de-nitrosilação é um mecanismo de modificação pós-traducional com reflexos sobre o controle espacial e temporal da função protéica (HESS et al., 2005). Assim, é possível que a disfunção da S-nitrosilação possa contribuir para patofisiologia de um grande número de doenças (FOSTER; HESS; STAMLER, 2009). Na depressão, o papel do NO ligado a S-nitrosilação ainda está por ser esclarecido, no entanto estudos mostraram que a atividade do receptor NMDA é inibida pela nitrosilação do resíduo

Cys399 da subunidade NR2A, resultando em uma proteção à neurotoxicidade glutamatérgica, efeito semelhante aos antagonistas de NMDA. Assim, é possível que processos de S-nitrosilação estejam envolvidos em distúrbios de humor (KIM et al., 1999; NELSON; CONNOLLY; MCARTHUR, 2003).

1.1.5.3.2. Canabinóides

A farmacologia do sistema canabinóide tem sido extensivamente explorada com resultados clínicos e pré-clínicos sugerindo seu envolvimento e possível alvo terapêutico deste sistema na diabetes, câncer, isquemia, ansiedade, estresse e depressão (IZZO et al., 2009).

A anandamida (*N*-aracdoniletanolamida) e o 2-AG (2-aracdonilglicerol) são os dois sinalizadores endógenos deste sistema e exercem suas funções por meio dos receptores ligados a proteína G, canabinóides 1 (CB1R) e 2 (CB2R). A anandamida pode ainda ativar o receptor vanilóide de potencial transiente (TRPV1). Por mecanismos dependentes da concentração de Ca^{2+} nos terminais pós-sinápticos ou ainda mediante ativação de receptores mGluR1, ocorre a degradação por fosfolipases de fosfolípidos de membrana precursores em anandamida e 2-AG. Estas moléculas, por sua vez, difundem-se facilmente podendo atuar em receptores usualmente localizados nos terminais pré-sinápticos. A sinalização cessa mediante internalização destas moléculas pelo transportador e hidrólise da anandamida e o 2-AG pelas enzimas hidrolase de ácidos graxos (FAAH) e lipase monoacilglicerol (MGL) respectivamente (PIOMELLI, 2003; HASHIMOTODANI; OHNO-SHOSAKU; KANO, 2007; LUTZ, 2009).

Uma série de novos compostos derivados dos endocanabinóides ou fitocanabinóides tem sido testada tendo como alvo tanto os receptores CB1 (de grande expressão no SNC) e TRPV1

como também o transportador e a enzima FAAH, com objetivo de obtenção de efeitos terapêutica (IZZO, BORRELLI, CAPASSO et al., 2009). No que diz respeito ao distúrbio de humor, foi verificado que o estresse crônico variado ou tratamento com glicocorticóides diminui a sinalização por endocanabinóides no hipocampo de ratos (HILL et al., 2005; HILL et al., 2008) e o tratamento crônico com antidepressivo tricíclico aumenta a densidade destes receptores no hipocampo e hipotálamo, o que poderia contribuir na redução das conseqüências comportamentais do estresse (HILL et al., 2006). Mesmo com divergências, estes achados se alinham à hipótese de que a redução da sinalização do sistema canabinóide no hipocampo e em áreas límbicas estariam ligado ao distúrbio tipo depressivo, o que parece ser confirmado pelos estudos farmacológicos mostram que os agonistas CB1 possuem efeito do tipo antidepressivo (GOBBI et al., 2005; HILL; GORZALKA, 2005; BAMBICO et al., 2007; MCLAUGHLIN et al., 2007; GAETANI et al., 2009). No entanto, existem resultados contraditórios sugerindo que os antagonistas canabinóides teriam efeito antidepressivo (WITKIN et al., 2005). Mesmo com estas contradições, o conjunto de resultados indica que o sistema endocanabinóide pode exercer influência importante sobre a modulação das respostas comportamentais ligadas ao humor.

1.1.6. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo tem emergido como um importante mecanismo não somente para os distúrbios neurodegenerativos como Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e Parkinson, mas também para aqueles ligados ao comportamento como distúrbio de humor bipolar, esquizofrenia, ansiedade e depressão (BERK et al., 2008b; NG et al., 2008).

Inicialmente foi relatado que pacientes maníaco-depressivos ou esquizofrênicos

apresentam nível reduzido de glutathione plasmático (L- γ -glutamyl-cisteinyl-glycine, ou GSH) um potente sequestrador endógeno de radicais livres (ALTSCHULE; SIEGEL; HENNEMAN, 1952). Posteriormente foi visto que o tratamento com antidepressivos previne o consumo deste antioxidante no córtex de camundongos submetidos ao modelo do estresse inescapável (PAL; DANDIYA, 1994). Um pouco mais recente, os estudos clínicos confirmam que o estresse oxidativo está presente entre os pacientes de depressão, sendo que para alguns deles, os marcadores de estresse são corrigidos pelo tratamento farmacológico antidepressivo (BILICI et al., 2001; HERKEN et al., 2007; SARANDOL et al., 2007). Efeito semelhante foi observado em animais submetidos ao estresse moderado crônico ao exibirem níveis menores de danos oxidativo no córtex, quanto tratados com venlafaxina, um inibidor da recaptação de 5-HT e NA (EREN; NAZIROGLU; DEMIRDAS, 2007).

Assim, parece evidente que o desbalanço entre as fontes de reativos de oxigênio e os mecanismos antioxidantes pode estar entre os mecanismos da etiologia do distúrbio depressivo, mesmo que ainda não esteja bem definido o mecanismo destes efeitos.

1.1.7. Mediadores imunológicos e depressão

O envolvimento de mediadores imunológicos em neuropatologia associadas a resposta à infecção, isquemia, traumatismo craniano ou a várias doenças neurodegenerativas tem sido relatado em estudos prévios. No entanto, são relativamente recentes as evidências do seu envolvimento nos distúrbio de humor. Notoriamente, pacientes com depressão apresentam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo potencial ligação entre a doença depressiva e o sistema imune (KHAIROVA et al., 2009). Além disso, várias condições médicas que envolvem a

ativação de mediadores pró-inflamatórios, dentre elas infecção viral, artrite reumatóide, câncer e doenças neurodegenerativas, são freqüentemente acompanhados de desordens depressivas (RAISON; CAPURON; MILLER, 2006).

Por outro lado, existem consistentes evidências mostrando que citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 1 (IL-1), (IL-6), interferon (INF) e seus receptores são constitutivamente expressos em várias regiões cerebrais. Além disso, trabalhos recentes têm mostrado correlação entre risco aumentado de depressão e redução na resposta ao tratamento com antidepressivos com níveis séricos elevados de TNF- α e IL-1. Estas evidências levantam a hipótese de que existiria um balanço intrínseco entre o papel fisiológico e patológico destas citocinas na patofisiologia da depressão. Além disso, considerando-se que TNF- α e IL-1 compartilham vias sinalizadoras que levam a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) ainda é possível supor que este fator tenha papel relevante nas funções neuronais constituintes e de neuroplasticidade (CONNOR; LEONARD, 1998; MULLER; ACKENHEIL, 1998; ANISMAN et al., 1999; GOSHEN et al., 2008; KHAIROVA, MACHADO-VIEIRA, DU et al., 2009). Esta hipótese ganha reforço por estudos mostrando que o desbalanço entre as citocinas pró e anti-inflamatória é atenuado pelo tratamento com antidepressivos como fluoxetina, sertralina e paroxetina (SUTCIGIL et al., 2007; TALER et al., 2007).

Os processos que associam os mediadores pró-inflamatório com a depressão podem envolver pelo menos três mecanismos. O primeiro deles poderia estar relacionado ao desbalanço glial da neurosinalização glutamatérgica. Com base nele, os efeitos neurotóxicos do glutamato estariam potencializados pelo aumento da disponibilidade deste neurotransmissor devido a 1) aumento da produção de glutamato pela ativação da via quinurenina na microglia, 2) redução da atividade do transportador de glutamato da microglia, e finalmente, 3) o aumento da ativação de

microglia e liberação de TNF- α e IL-1 por mecanismo de *feedback* positivo (MCNALLY; BHAGWAGAR; HANNESTAD, 2008). Em segundo lugar, a ativação de receptores para IL-1 ou TNF- α , por meio da indução de NF- κ B, inibe a fase inicial e tardia da formação de LTP e por fim a ativação de mecanismos pró-inflamatórios associados à enzima ciclooxigenase 2 (Cox2). Nesse sentido, a co-administração de inibidores desta enzima aumenta a eficácia dos antidepressivos (MULLER et al., 2006; MCNALLY; BHAGWAGAR; HANNESTAD, 2008; AKHONDZADEH et al., 2009). Assim, apesar de ainda não estar absolutamente claro os mecanismos pelos quais os mediadores imunológicos, sejam eles produzidos no SNC ou periféricamente, contribuem na instalação ou manutenção do quadro depressivo, é provável que o desbalanço neste sistema possa ter papel relevante no distúrbio depressivo.

1.1.8. Mecanismos epigenéticos

Os mecanismos ditos epigenéticos retratam mudanças na função gênica sob a influência de fatores ambientais. Essas mudanças ocorreriam sem relação direta com alterações na sequência de DNA, mas sim com mudanças persistentes na função e viabilidade de proteínas. Estas alterações decorreriam, por exemplo, de modificações covalentes no DNA (como, por exemplo, a metilação de DNA) e modificações pós-traducionais da cauda N-terminal de histonas (como, por exemplo, a acetilação e metilação), ou ainda por mecanismos de silenciamento gênico por repressão da tradução (por exemplo, os RNA de interferência) (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Os mecanismos epigenéticos, por produzirem modificações persistentes nas funções do DNA, são particularmente atrativos para explicar vários aspectos da depressão como discordância entre gêmeos idênticos quanto à susceptibilidade à depressão, diferenças individuais entre

animais de linhagens endogâmicas, a facilidade de recaída tão característico da depressão, além de sua maior prevalência no gênero (MILL; PETRONIS, 2007).

Alterações epigenéticas vêm sendo implicadas em diferentes transtornos psiquiátricos (TSANKOVA et al., 2007). Em relação à depressão foi visto que a metilação de DNA (da citosina) na primeira semana após o nascimento parece ser importante na influência do comportamento maternal sobre o processamento de respostas emocionais no animal adulto. Filhotes de mães que dispensam menores cuidados parentais, como lambar e limpeza, são mais ansiosos e apresentam menor expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo, comparado aos filhotes de mães normais. Esta resposta decorre da repressão da expressão gênica por aumento de metilação na região promotora do gene. O tratamento com antidepressivos e inibidores da histona deacetilação parecem reverter estes efeitos (WEAVER, CERVONI, CHAMPAGNE et al., 2004). Além disso, foi verificado que inibidores da histona deacetilase têm efeito tipo-antidepressivo em ratos submetidos ao estresse de derrota social (COVINGTON et al., 2009; WEAVER, 2009). Curiosamente, o aumento da acetilação de histonas na região do promotor do gene para BDNF no hipocampo parece ser necessário para que a imipramina reverta o déficit comportamental induzido pela derrota social (TSANKOVA et al., 2006).

2. OBJETIVO GERAL

As evidências revisadas acima indicam que a depressão é uma desordem de etiologia complexa que não resulta da influência isolada de fatores genéticos ou ambientais, mas sim de uma combinação extensa de fatores genéticos com relativa pequena participação individual e que interagem com fatores ambientais (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000). Assim, o presente estudo avaliou, através de análise em larga escala ao nível genômico e proteômico, a hipótese de que o distúrbio tipo depressivo está associado à modulação de diversos grupos gênicos em resposta a um estímulo estressor e que os efeitos benéficos do tratamento crônico com antidepressivo típico (imipramina) ou potencial (inibidor preferencial da sintase neuronal de óxido nítrico) estão relacionados à modulação destes grupos. Além disso, os resultados poderão identificar possíveis novos alvos terapêuticos neste distúrbio.

2.1. Objetivos específicos

- 2.1.1. Identificar genes expressos no hipocampo em animais submetidos a evento estressor por nado forçado (GOSHEN, KREISEL, BEN-MENACHEM-ZIDON et al.) sem tratamento com a imipramina e inibidor da nNOS;
- 2.1.2. Identificar genes expressos no hipocampo exclusivamente sob o tratamento sub-crônico com a imipramina e inibidor da nNOS, sem ocorrência de evento estressor por NF;
- 2.1.3. Identificar genes expressos no hipocampo sob o tratamento com as drogas imipramina e inibidor da nNOS e submetidos ao NF;
- 2.1.4. Identificar possíveis alvos moleculares para terapia da depressão;
- 2.1.5. Considerando os resultados encontrados sugerindo o envolvimento de estresse oxidativo nas consequências da exposição a estressores e efeito dos antidepressivos, um objetivo adicional foi o de verificar se o tratamento com uma droga antioxidante, a N-acetil-L-cisteína, produzirá efeitos antidepressivos em ratos submetidos ao modelo de nado forçado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 200 – 220g, provenientes do Biotério Central da Farmácia, USP, acomodados em condições padronizadas de luz (12:12h de claro/escuro, com ciclo claro iniciando as 06:30h) e temperatura ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), acesso irrestrito à água e alimento, serão utilizados neste estudo. Os procedimentos experimentais foram conduzidos em conformidade com o guia de manipulação de animal de laboratório da Sociedade Brasileira Neurociências Comportamentais, e os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética local.

3.2. Grupos de experimentais e drogas

As dosagens das drogas 7-nitroindazole (7NI, 60mg/Kg; Sigma Chemical), hidrocloreto de imipramina (15mg/Kg, Sigma Chemical) e veículo (DMSO:salina 1:1), foram administradas por via intra-peritoneal 1 vez ao dia (11:00am-13:00pm) por 14 dias consecutivos. As doses e esquema de tratamento foram estabelecidos segundo estudos prévios na literatura e estudos conduzidos no próprio laboratório no qual estabeleceram o efeito antidepressivo do tratamento com 7NI sobre em ratos submetidos ao modelo do forçado (DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997; YILDIZ, ERDEN, ULAK et al., 2000; JOCA; GUIMARAES, 2006). Os grupos experimentais foram compostos por 5-8 animais cada, distribuídos como descrito a seguir:

- Grupo 1: os animais receberam tratamento com veículo (VEH) crônico sem passar pelo estresse do nado forçado (NAI) e foram sacrificados 3h após a última injeção (VEH + NAI);
- Grupo 2: os animais receberam tratamento crônico com 7NI sem passar pelo estresse do nado forçado e foram sacrificados 3h após a última injeção (7NI + NAI);
- Grupo 3: os animais receberam tratamento crônico com veículo, e foram submetidos ao modelo do nado forçado (FST) (VEH + FST);
- Grupo 4: os animais receberam o tratamento crônico com o 7-NI e foram submetido ao modelo do nado forçado (7NI + FST);
- Grupo 5: os animais receberão o tratamento crônico com imipramina e foram submetidos ao modelo do nado forçado (IMI + FST).

3.3. O teste do nado forçado

Os animais foram colocados individualmente em um recipiente acrílico (40 cm de profundidade e 20 cm de diâmetro) preenchido 30 cm com água a temperatura de 23-25°C. Segundo procedimentos previamente descritos por Porsolt (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977) a sessão pré-teste teve duração de 15 min, seguida pelo teste de 5 min, 24h após. Os tempos de imobilidade e latência foram registrados para cada animal durante a sessão teste. A sessão teste foi realizada 1h após a última injeção, e os animais foram sacrificados 2h após o teste para retirada do hipocampo. Os animais do grupo 1 e 2 foram sacrificados 3h após a última injeção.

3.4. Análises moleculares

3.4.1. Extração de RNA total e análise SAGE

Os animais foram anestesiados com uretana 25% (1ml/kg) e sacrificados por decapitação para dissecação do hipocampo. Imediatamente após a retirada do hipocampo, o mesmo foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior análise. A extração do RNA total procedeu-se segundo método de estabelecido pelo fabricante do reagente TriZol (Invitrogen, CA). O RNA total obtido foi quantificado e sua qualidade conferida em gel de agarose 1,5%, e armazenado a -80°C, para posterior análise SAGE. A fração do produto de extração contendo as proteínas também foi armazenada a -80°C para posterior purificação das proteínas e análise.

As análises SAGE foram desenvolvidas segundo metodologia do fabricante (Invitrogen, CA) sendo que foram empregadas de 30-35 ng de RNA total para cada biblioteca SAGE. Foi realizado mistura de RNA total de 3-4 animais por grupo nas mesmas proporções para obter-se a quantidade final de RNA. Em seguida foi realizada a síntese de cDNA a partir dos RNAs+Poli(A) utilizando iniciadores ligados à biotina. Os cDNAs foram então clivados com enzima de restrição *NlaIII* e os fragmentos 3'-terminal foram selecionados pela ligação biotina/estreptavidina ligada à partícula magnética. Os oligonucleotídeos com sítio para a enzima BsmIF1 foram liberados pela digestão com esta enzima, sendo então ligados uns aos outros pela DNA ligase, e clonados no sítio SphI do vetor pZero 1.0. Os clones com inserto superior a 400pb foram seqüenciados usando iniciadores M13. As seqüências identificadoras (*tags*) foram

extraídas pelo programa SAGE versão 3.04, e submetidas ao bando de dados disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE>) para banco de seqüências SAGE.

3.4.2. Extração de proteínas totais e análise por MS/MS espectrometria de massa

O extrato de proteínas totais foi separado da fase orgânica resultante da extração de RNA total segundo protocolo previamente descrito (FERREIRA et al., 2009, em preparação). A concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford (BioRad, CA). Para cada grupo experimental realizou-se a corrida de três géis bi-dimensionais, utilizando-se 1 mg de proteínas totais. Esta quantidade de proteína foi obtida tomando-se do extrato bruto de proteína de 3-4 animais por grupo experimental, nas mesmas proporções de cada animal. A focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi realizada em tiras de 18 cm e gradiente de 3-10 pH (Amersham, SE) em Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare, CA). Em seguida, as tiras foram submetidas à corrida em gel SDS (segunda dimensão) no Ettan DALT six (GE Healthcare, CA). Após a coloração com Comassie blue, dois dos géis de cada grupo experimental que apresentaram reprodutibilidade superior a 95% foram analisados no programa *Image Master 5.0* (Amersham, SE). O nível de expressão de cada proteína (*spots*) foi estimado utilizando-se a média das porcentagens de volume dos *spots* entre as duplicatas, isto é, volume relativo do *spot* em relação ao volume total dos *spots* presentes no gel, médio entra as duplicatas. Após o tratamento estatístico, os *spots* foram recortados dos géis e submetidos à digestão por tripsina segundo metodologia previamente descrita (Pereira et al. 2005) e sequenciamento por espectrometria de massa (MS) em espectrômetro tipo MALDI-TOF. O *peptid finge print* foi

analisado em programa pelo método Mascot e as proteínas correspondentes identificadas no banco de dados protéico do NCBI. (<http://prospector.ucsf.edu/cshtml4.0/msfit.htm>). Adotou-se o nível de identidade *Mascot score* (MS) (na identificação das proteínas pelos íons detectados) ≥ 36 , como recomendado pelo programa.

3.5. Efeito da N-acetil-L-cisteína sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado

A propriedade do tipo antidepressiva do NAC foi avaliada pelo modelo do nado forçado. Os animais (ratos Wistar, N = 4-7 por grupo) foram colocados individualmente em um recipiente acrílico (40 cm de profundidade e 20 cm de diâmetro) preenchido 30 cm com água a temperatura de 23-25°C, por 15 min na sessão pré-teste. O tempo de imobilidade e latência foram registrados 24h após o pré-teste, por um período de 5 min ao recolocar os animais no recipiente nas mesmas condições (sessão teste) (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977). Hidrocloreto de imipramina (Sigma Chemical, na dose de 15mg/Kg) ou NAC (Sigma Chemical, nas doses de 5; 15; 50; 150 e 250 mg/Kg) foram dissolvidos em solução salina e administradas intraperitonealmente (i.p. a 2.0 mL/Kg) no momentos: imediatamente após o pré-teste, 5h depois e 1 h antes do sessão teste. As doses de NAC foram escolhidas com referência em estudos anteriores que mostraram seus efeitos no SNC (KNUCKEY et al., 1995; HARVEY et al., 2008; VALVASSORI et al., 2008).

Os efeitos da droga sobre a atividade exploratória em campo aberto (arena de 60 cm de diâmetro e parede em acrílico) também foi medida em grupos animais independentes para avaliar possível interferência na atividade locomotora geral. A arena estava localizada em local com ruído sub-atenuado, temperatura controlada (25±1°C) e iluminação fluorescente de 40W situada a

4 m acima do aparato. Os animais (ratos Wistar, N = 5-7 por grupo) foram pré-expostos no aparato por 10 min, 24 h antes da sessão teste. A distância percorrida foi medida durante 5 min de sessão teste usando o programa ANY-maze Vídeo Tracking (versão 4.5; Stoelting Co, 2007), 1 h após a administração das drogas.

3.6. Análise dos dados

O tratamento estatístico dos resultados dos testes de nado forçado foi realizado por análise de variância (one-way ANOVA), seguida pela comparação entre os grupos pelo teste de Duncan. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

A análise de cobertura do genoma expresso para cada biblioteca foi realizada pela curva da relação entre *tags* seqüenciadas pelo número de novas *tags* identificas. As curvas foram comparadas pela análise de variância, sendo considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

As bibliotecas dos 5 grupos foram comparadas entre si, segundo riqueza de genes expressos e nível de expressão pelo ensaio de agrupamento hierárquico pelo programa GeneCluster 2.0 (Cambridge, MA), para determinação do nível de similaridade-divergência entre os tratamentos.

O tratamento estatístico do nível de expressão das seqüências foi realizado pelo teste de intervalo de confiança, segundo metodologia proposta SAGEic (VENCIO; BRENTANI; PEREIRA, 2003), sendo que as bibliotecas foram comparadas duas a duas, da seguinte forma: grupo 1 (VEH + NAI) contra grupo 3 (VEH + FST); grupo 3 (VEH + FST) contra grupo 4 (7NI + FST); grupo 3 contra grupo 5 (IMI + FST). As bibliotecas dos grupos 1 e 2 não foram

comparados por este método, uma vez que o ensaio de agrupamento hierárquico acusou alta similaridade entre estes grupos. Pelo teste de agrupamento hierárquico a mesma similaridade foi encontrada entre os grupos 3 e 4. No entanto manteve-se a comparação pelo SAGEic com a finalidade de se avaliar os genes que mantiveram o mesmo nível de expressão entre estes grupos (3 e 5), sendo que os animais do grupo 3 apresentaram efeito antidepressivo.

O nível de expressão de cada proteína (*spots*) foi estimado utilizando-se a média das porcentagens de volume dos *spots* entre as duplicatas, isto é, volume relativo do *spot* em relação ao volume total dos *spots* presentes no gel. Os *spots* de proteínas deferentemente expressas foram identificados a partir da comparação segundo os mesmo grupos realizados para as bibliotecas SAGE. Considerou-se significativamente diferente os *spots* que apresentaram porcentagem de volume variando pelo menos duas vezes, e nível de significância superior $P < 0,05$ pelo teste *t*.

Por fim, a análise de enriquecimento gênico, a qual acusa qual processo biológico possui maior representabilidade, isto é, os processos biológicos que sofreram maior influência sobre a modulação da expressão gênica, foi realizada empregando-se o programa MetaCore submetendo-se os genes ou proteínas identificados como diferentemente expressos pelos testes SAGEic ou teste *t*. Os genes foram distribuídos no teste de enriquecimento segundo o banco de dados do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome* (KEGG) ou no banco de vias metabólicas do GeneGo.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos comportamentais da imipramina e 7NI

Durante este período foram realizados os ensaios comportamentais no teste do nado forçado no qual foi verificado que o tempo de imobilidade foi significativamente [$F_{(2-18)}=15,83$ $p = 0,0001$] menor entre os animais submetidos ao tratamento crônico de 14 dias com 7-NI ($111,80 \pm 60,08s$, $N = 5$) e imipramina ($104,62 \pm 25,69s$, $N = 8$), quando comparados ao grupo veículo ($222,12 \pm 17,96s$, $N = 8$). Neste mesmo sentido, as latências para o primeiro episódio de imobilidade foram maiores [$F_{(2-18)}=9,66$ $P = 0,0014$] entre os animais tratados com 7NI ($118,00 \pm 18,97$, $N = 8$) e imipramina ($155,00 \pm 28,18$, $N = 8$) comparados ao grupo veículo ($46,00 \pm 6,22$, $N = 5$) (Figura 1). Assim, o presente estudo confirma o efeito tipo antidepressivo pela inibição sistêmica crônica do óxido nítrico sintase neuronal.

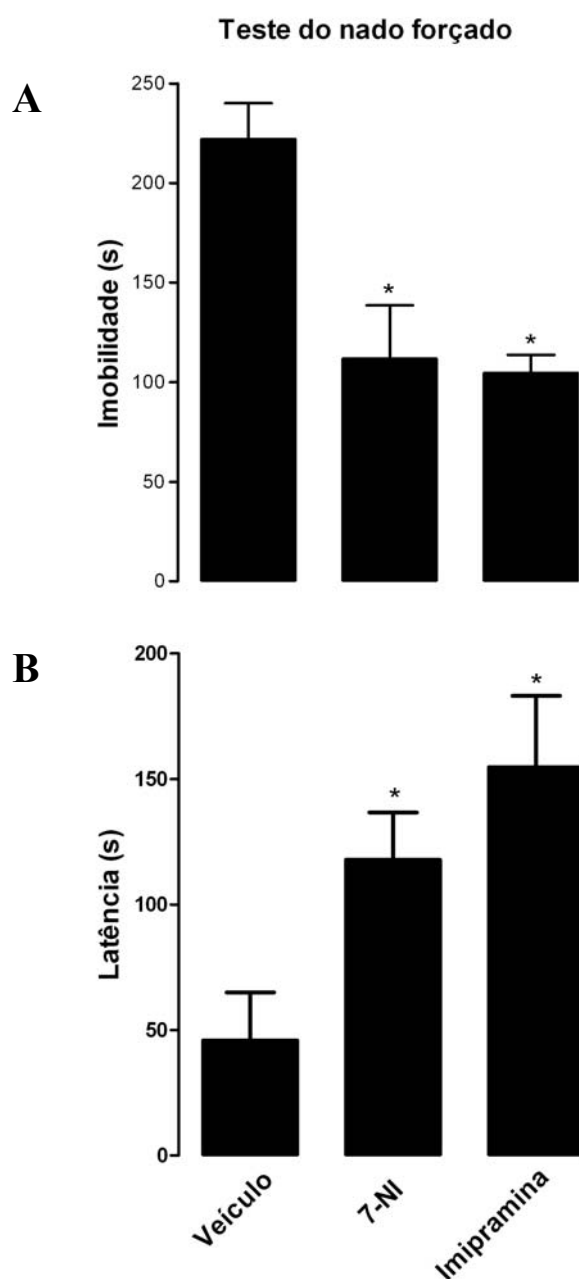


Figura 1. Efeito do tratamento intraperitoneal com veículo (DMSO:salina, 1:1, 1 ml/Kg), 7-Nitroindazole (7-NI, 60 mg/Kg) ou imipramina (15 mg/Kg) por 14 dias sobre a imobilidade (A) e latência (B) de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais (N = 5 – 8) receberam injeções diárias por 14 dias, sendo a última injeção 1 h antes da sessão teste. As barras representam +SEM. * $P < 0,05$ comparado ao veículo pelo teste de Duncan.

4.2. Resultados obtidos nas análises moleculares

4.2.1. Análise do padrão de expressão gênica global por meio da tecnologia SAGE

4.2.1.1. Análise da cobertura do transcriptoma por seqüenciamento de tags SAGE

Ao final do seqüenciamento de 61.272, 62.031, 60.471, 61.390 e 60.754 *tags* para o grupo 1 a 5 respectivamente, foi possível identificar e quantificar a expressão de 26.406, 26.256, 19.270, 19.072 e 24.936 genes no hipocampo dos animais destes grupos. Pela análise de ajuste à curva hiperbólica, a partir dos dados de geração de novas *tags* em relação ao número total de *tags* seqüenciadas, foi possível verificar que houve uma cobertura do genoma expresso, uma vez que para todas as bibliotecas produzidas há o ajuste ($R^2 > 0.99$) à curva hiperbólica com saturação no eixo das abscissas, o que significa que o seqüenciamento de mais *tags* não geraria quantidades significativas de novas *tags* que compensasse a relação custo-benefício.

A comparação entre as curvas também revelou diferença significativa entre as bibliotecas SAGE para os animais tratados com veículo ou imipramina e submetidos ao FST, em relação às demais bibliotecas [$F_{(4, 34)} = 23,01$; $P < 0.0001$]. Esta análise é sugestiva de que as bibliotecas SAGE daqueles grupos apresentam um número maior de genes expressos em relação a estes grupos, dado que, para um número menor de *tags* analisadas é obtido um número maior de *tags* únicas (Figura 2).

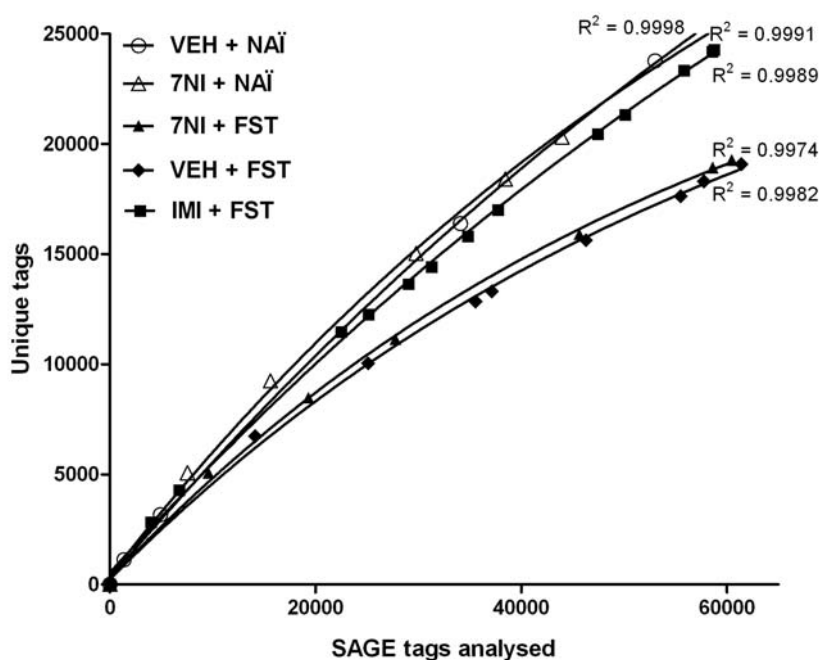


Figura 2. Curva de subtração de tags em biblioteca SAGE. Relação entre o número de novas seqüências tags (Unique tags) pelo número total de seqüências identificadas nas bibliotecas (SAGE tags analysed). VEH + NAİ = animais tratados com veículo (N=4; salina:DMSO, 1:1, 2mL/Kg por 14 dias), 7NI + NAİ = animais tratados com 7NI (N=4; 60mg/Kg/14 dias), VEH + FST = animais tratados com veículo (N=4; salina:DMSO, 1:1, 2mL/Kg por 14 dias) e submetidos ao FST, 7NI + FST = animais tratados com 7NI (N=3; 60mg/Kg por 14 dias) e submetidos ao FST, IMI + FST = animais tratados com imipramina (15mg/Kg por 14 dias) e submetidos ao teste do nato forçado. R^2 = ajuste das curvas a hipérbole.

4.2.1.2 Análise de Agrupamento Hierárquico

A análise de agrupamento hierárquico, o qual estabelece a relação de similaridade e distância entre as bibliotecas segundo o padrão global de expressão gênica, identificou pelo menos dois grupos distintos. O primeiro grupo corresponde ao dos animais submetidos ao estresse pelo nado forçado e aos animais não estressados (naïve). Além disso, dentro do grupo dos animais estressados, o padrão de expressão gênica dos animais tratados com imipramina, difere significativamente dos demais animais tratados com 7NI ou veículo. Esta análise sugere um efeito dominante do estresse sobre o padrão de expressão gênica em detrimento à resposta antidepressiva do tratamento farmacológico, além de sugerir que o tratamento com a imipramina promove uma alteração mais extensa no padrão de expressão gênica se comparado aos efeitos do 7NI. Assim, a manutenção do efeito antidepressivo do 7NI com menor alteração no padrão geral de expressão gênica, se comparado ao efeito da imipramina, é sugestivo de que o 7NI possa exercer seus efeitos comportamentais atuando sobre grupos gênicos de forma mais específica (Figura 3).

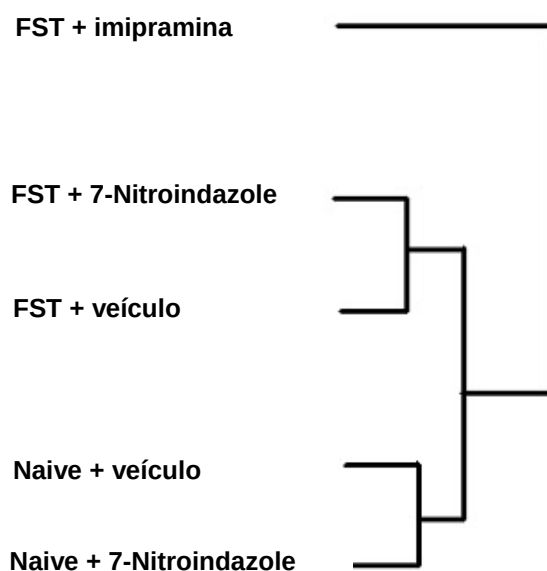


Figura 3. Cladograma de análise de agrupamento hierárquico. VEH + NAI = animais tratados com veículo (N=4; salina:DMSO, 1:1, 2mL/Kg por 14 dias), 7NI + NAI = animais tratados com 7NI (N=4; 60mg/Kg/14 dias), VEH + FST = animais tratados com veículo (N=4; salina:DMSO, 1:1, 2mL/Kg por 14 dias) e submetidos ao FST, 7NI + FST = animais tratados com 7NI (N=3; 60mg/Kg por 14 dias) e submetidos ao FST, IMI + FST = animais tratados com imipramina (15mg/Kg por 14 dias) e submetidos ao teste do nato forçado. R^2 = ajuste das curvas a hipérbole.

4.2.1.3. Análise da expressão gênica diferencial por estratégia SAGE

Com o objetivo de avaliar os efeitos do estresse e dos tratamentos com drogas do tipo antidepressivas sobre o padrão de expressão gênica no hipocampo de ratos foi realizada a comparação do nível de expressão dos genes das bibliotecas SAGE para os grupos experimentais VEH + NAI, 7NI + FST e IMI + FST em relação à biblioteca SAGE para o grupo VEH + FST. Quando foram comparados os grupos tratados com veículo e submetidos ou não ao estresse do nado forçado foi verificado que o grupo VEH + FST teve 1312 (89,32%) genes com expressão induzida, enquanto somente 157 (10,68%) genes tiveram sua expressão suprimida no grupo VEH + FST em relação ao grupo VEH + NAI, de um total de 1469 genes diferentemente expressos entre os dois grupos.

Efeito semelhante pode ser observado na comparação do grupo VEH + FST com os grupos 7NI + FST e IMI + FST. De um total de 1201 genes analisados, 1078 (89,76%) mostraram expressão aumentada no grupo VEH + FST, enquanto 123 (10,24%) estavam aumentados no grupo 7NI + FST, de um total de 1201 genes diferentemente expressos. Da mesma forma, 1514 (89,75%) apresentaram expressão aumentada no grupo VEH + FST enquanto somente 173 (10,25%) estavam aumentados no grupo tratado com imipramina (Figura 4). Para as três comparações, o estresse comportamental isolado (VEH + FST) aumentou a expressão gênica quando comparado aos grupos VEH + NAI (intervalo de confiança: -8,97 a -8,0), 7NI + FST (intervalo de confiança: -9,70 a -8,9) e IMP + FST (intervalo de confiança: -8,79 a -7,72).

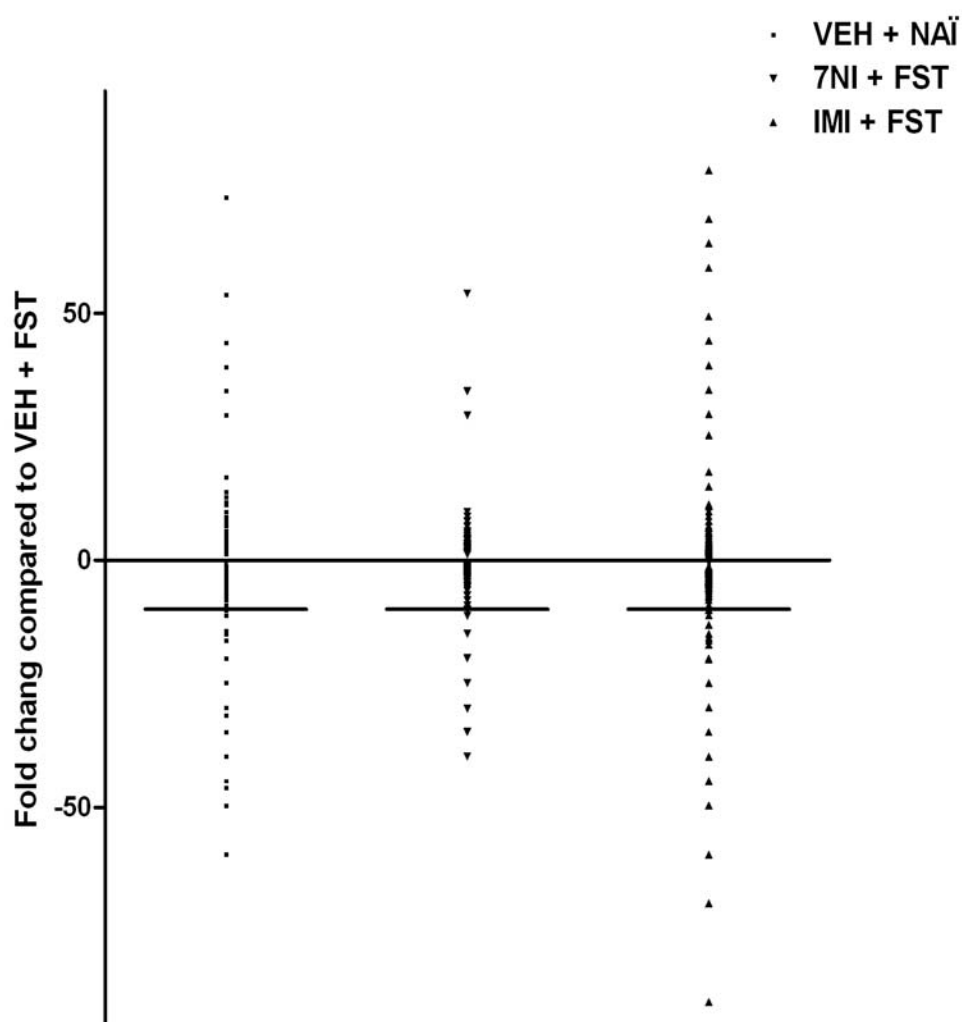


Figura 4. Taxa de alteração da expressão gênica em *fold change* para as bibliotecas SAGE dos grupos VEH + NAI, 7NI + FST e FST + IMI em relação ao grupo VEH + FST. VEH + NAI = animais tratados com veículo (N=4; salina:DMSO, 1:1, 2mL/Kg por 14 dias) e não submetidos ao FST, 7NI + FST = animais tratados com 7NI (N=3; 60mg/Kg por 14 dias) e submetidos ao FST, IMI + FST = animais tratados com imipramina (15mg/Kg por 14 dias) e submetidos ao teste do nato forçado, VEH + FST = animais tratados com veículo (N=4; salina:DMSO, 1:1, 2mL/Kg por 14 dias).

4.2.1.4. Análise de enriquecimento pelo MetaCore

Inicialmente investigou-se o enriquecimento entre os genes diferencialmente expressos para as bibliotecas dos animais tratados com veículo não submetidos ao estresse pelo nado forçado (VEH + NAI) e a biblioteca do grupo dos animais tratados com veículo e submetidos ao teste do nado forçado (VEH + FST). Esta comparação foi realizada com o objetivo de identificar o efeito do estresse sobre a modulação gênica no hipocampo. Dentro os principais processos fisiológicos significativamente enriquecidos estão os de fosforilação oxidativa, controle de processos pró-anti-apoptóticos e remodelagem de citoesqueleto (Tabela 1).

O estresse comportamental induzido pelo FST aumentou de forma significativa a expressão de pelo menos 25 genes, enquanto reprimiu a expressão de pelo menos 4 genes. Dentre os genes que tiveram sua expressão induzida, foram destacados o Cytochrome c oxidase polypeptide 6A1 mitocondrial, NADH desidrogenase e ATP sintase mitocondrial, os quais tiveram indução de ao menos 9 vezes nos animais submetido ao FST em relação ao controle (Figura 5, Tabela 1).

Tabela 1: Processos biológicos modulados segundo análise de enriquecimento pelo método MetaCore, para os genes diferencialmente expressos entre os grupos VEH+NAI e VEH+FST.

Principais mapas de vias GeneGo	N genes	P
Fosforilação oxidativa	29	$2,68^{-11}$
Apoptose e/ou proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A	20	$2,6^{-8}$
Remodelagem de citoesqueleto por Rho GTPase	11	$3,45^{-7}$
Remodelagem de citoesqueleto de neurofilamentos	11	$7,9^{-7}$

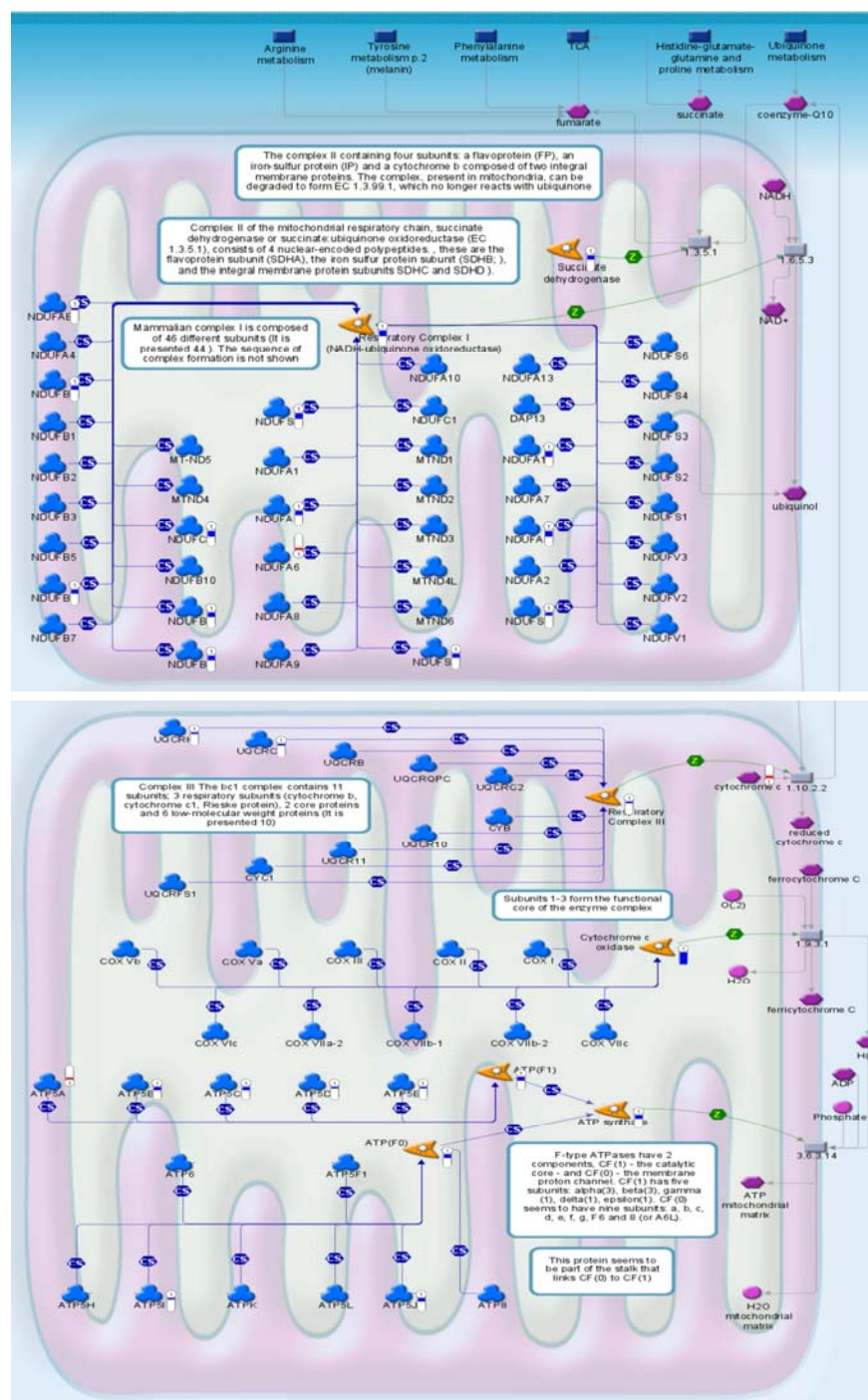


Figura 5. Genes envolvidos com o processo fisiológico de Fosforilação oxidativa segundo banco de dados GeneGo. Colunas marcadas pelo número 1 indicam a taxa de alteração para os genes diferentemente expressos. As colunas marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH+FST e em vermelho indicam a taxa de aumento de expressão, no grupo VEH+NAI.

Tabela 2: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH + FST e VEH + NAI para os processos fisiológicos ligados ao fosforilação oxidativa, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
AGAACTGCAG	Sdhb	Succinate dehydrogenase (ubiquinone) subunit mitochondrial: Complexo II da cadeia respiratória, a qual é especialmente envolvida na oxidação do succinato, carrear eletrons da FADH para CoQ. O complexo é composto por quatro subunidade e está localizada internamente nas membranas mitocondriais.	-9,92	[0; 2,57]
TAGACACAGC	Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subunit 11, 5, 2 e Fe-S:	-14,88	[0; 1,7]
GGCATAATTA	Ndufa3	catalisa o primeiro passo na cadeia respiratória mitocondrial, na qual	-9,92	[0; 2,57]
TTACTGACTT	Ndufa5	transfere o elétron do NADH para a ubiquinona (coenzima Q) em	-14,88	[0; 1,7]
TTAATATTTA	Ndufa6	decorrência da translocação dos prótons pela crista mitocondrial.	3,95	[1,08; 24]
ATGGCATCGT	Ndufab1		-1,98	[-3,35; -1,22]
CGCTCGACCT	Ndufb4		-9,92	[0; 2,57]
TGGCTACTAA	Ndufb6		-9,92	[0; 2,57]
TTCCCTTCCT	Ndufb8		-9,92	[0; 2,57]
CTTGCAAGTG	Ndufb9		-9,92	[0; 2,57]
GCCCGGCCGG	Ndufe2		-14,88	[0; 1,7]
ACTCAGCAAT	Ndufs5		-14,88	[0; 1,7]
TGGGCTGGTG	Ndufs7		-9,92	[0; 2,57]
AGGAGTTGCT	Ndufs8		-5,07	[-32,33; -1,38]
AGCGCCCAGA	Cox6a2	Cytochrome c oxidase (COX): é a enzima final da cadeia respiratória	-34,72	[0; 0,69]
GGCCGCCCCA	Cox6a1	mitocondrial. É um complexo enzimático com múltiplas subunidades	-39,68	[0; 0,59]
TTAATAAATG	Cox4i1	que acopla a transferência dos eletrons do citocromo c para o	2,19	[1,17; 4,26]
GTGACAACCTG	Cox8a	oxigênio, e contribui com o gradiente de prótons através da matriz	-2,26	[-2,85; -1,78]
		mitocondrial. O complexo consiste de 13 subunidades nucleares e		
		mitocondriais. Cysc: fragmentação de DNA associada a apoptose.		
AATGGCTAAC	Cysc	Cytochrome c, somatic	6,9	[1,27; 3,40282 ³⁸]
TTCTGGCTGC	Uqcrc1	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	-2,30	[-4,88; -1,17]
GGAAAGCTGG	Atp5b	ATP sintase, transporte de H ⁺ , complexo mitocondrial F1: catalisa a	-9,92	[0; 2,57]
TTCTCAGCAG	Atp5c1	síntese de ATP utilizando o gradiente de prótons na matriz		
GTTGAGTCTG	Atp5j	mitocondrial.		
CCAGTCCTGG	Atp5g1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C1 (subunit 9)	-299	[-5,25; -1,86]
GCATACGGCG	Atp5i	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e	-2,33	[-4,88; -1,17]
GAGGGCTTCC	Atp5d	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	-2,07	[-3,35; -1,33]
CGGGATCTGC	Atp5o	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	-2,10	[-3; -1,44]
TGGGCACCTG	Atp5e	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	-2,27	[-3,35; -1,56]
CAGAGTCGCT	Uqcrh	Ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	-1,93	[-3,35; -1,17]

FC = taxa de alteração. Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo VEH + NAI em relação ao grupo VEH + FST.

O estresse aparentemente também induziu a expressão de genes associados ao controle de apoptose-proliferação mediante sinalização por receptor 5-HT1A. Pelo menos três vias intrínsecas foram apontadas por esta análise. A primeira delas estaria ligada à ativação de família de proteína G alfa inibitória (Gi), adenilato ciclase, proteína regulatória PP2A com modulação final sobre a proteína BAX (Gi-ADC-PP2A-BAX), tendo como resultado o direcionamento pró-apoptótico. Neste mesmo sentido, o acionamento das vias iniciadas com a proteína G(0), ativação da família de proteína quinases de serina/treonina (AKT/PKT), com resultado final de inibição do mecanismo anti-apoptótico mediados por NF-kB e inibição da proteína ativadora de mitose (ERK2-MAPk1), via Gi-AKT/PKT-(inibição de NF-KB ou MAPK1). Por outro lado, o estresse do nado forçado promoveu aumento da expressão dos fatores de transcrição NF-kB, e do inibidor de caspase 3, o Poly-ADP-ribose, além das proteínas ERK2-MAPk1.

A modulação destes mecanismos que controlam os processos apoptóticos-proliferativos mediados por STAT-3/NF-kB/Bcl-BAX-citocromo-C/ERK é sugestivo de que a sinalização serotoninérgica neste sistema teria a função de inibir a tendência apoptótica induzida pelo estresse oxidativo, danos de DNA, estresse metabólico, tendo portanto, efeito neuroprotetor em resposta aos efeitos neurodegenerativos promovidos pelo estresse. (Figura 6, Tabela 3).

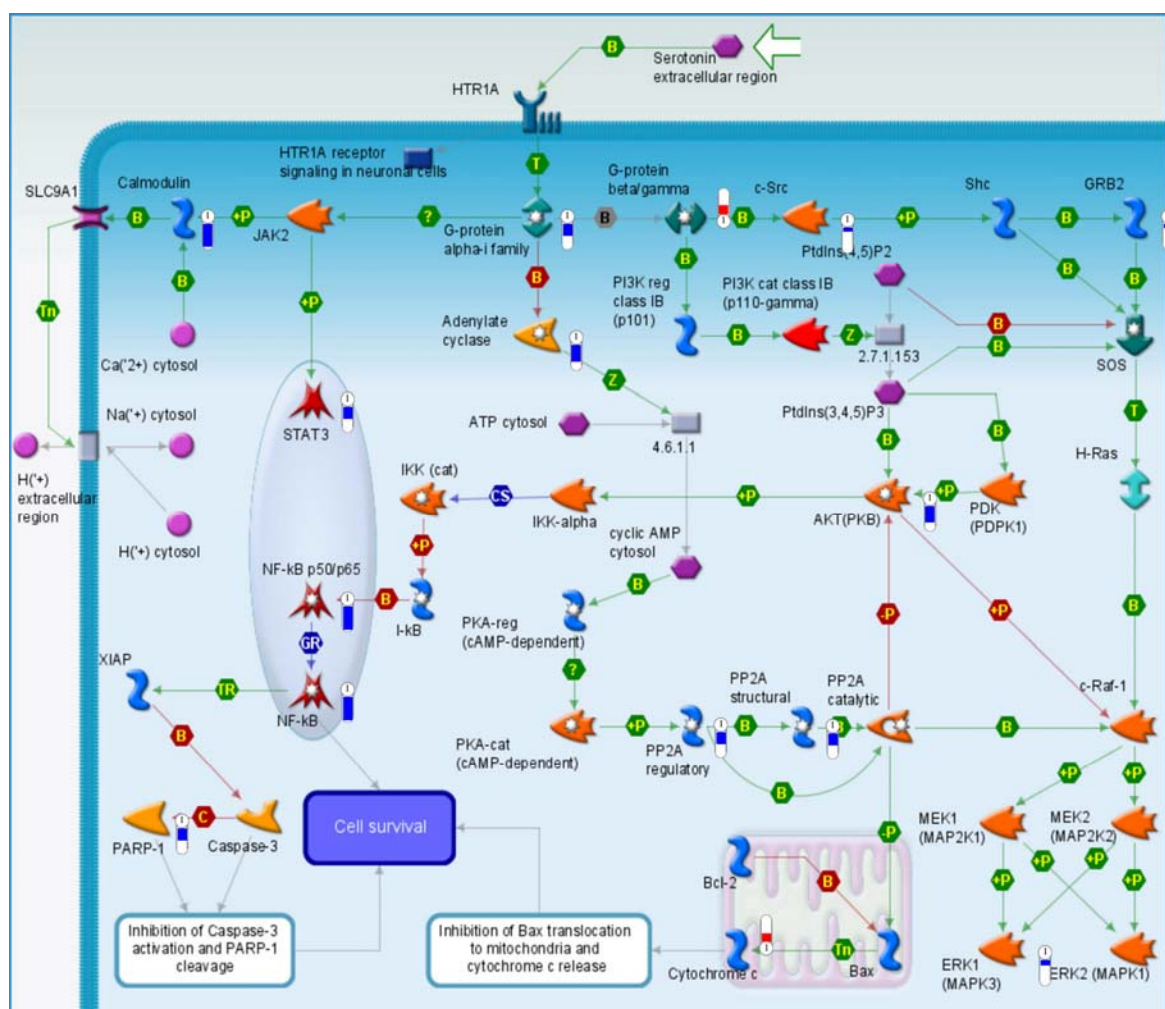


Figura 6. Genes envolvidos no processo fisiológico de Apoptose e/ou proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A segundo banco de dados GeneGo. Colunas marcadas pelo número 1 indicam a taxa de alteração para os genes diferentemente expressos. Colunas marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH+FST. Colunas marcadas em vermelho indicam a taxa de aumento de expressão no grupo VEH+NAI.

Tabela 3: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH+FST e VEH+NAI para os processos fisiológico relacionados à apoptose e/ou proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
ACCTTTGGCC	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 1: proteína G envolvida como um modulador ou transdutor em vários sistemas sinalizadores transmembrânicos. As subunidades alfa e beta são necessárias para atividade GTPase, para reposição do GDP por GTP, e para a interação do proteína efetora G.	-9,92	[0; 2,57]
GGCAATATCC	Adcy3	Adenylate cyclase type 3	-14,88	[0; 1,7]
AATGGCTAAC	Cycs	Cytochrome c, somatic	6,91	[1,27; 3,4 ³⁸]
TTTTTTGTG	Ppp2r1a	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform;	-2,91	[-6,69; -1,38]
GTCTGCTCCC	Ppp2r5b	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), beta isoform;	-2,45	[-4,88; -1,27]
AAGTCTTTCT	Ppp2r5c	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B' gamma isoform;	-9,92	[0; 2,57]
GCTCCCTGGA	Ppp2r5d	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), delta isoform: Ativam a proteína BAX que por sua vez atua acelerando os processos apoptóticos por se ligar e antagonizar o repressor de apoptose BCL2, e induz a liberação de citocromo C e a ativação de caspase 3, precipitando apoptose.	-9,92	[0; 2,57]
GGGTGCAGCG	Akt2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	-14,88	[0; 1,7]
GGATTGGGGC	Calm1	Calmodulin 1: Calmodulin mediates the control of a large number of enzymes and other proteins by Ca(2+). Está entre as enzimas a serem estimuladas pelo complexo calmodulin-Ca(2+) e várias proteínas fosfatases e quinases. Junto à CEP110 e centrina, está envolvida em uma via genética que regula o ciclo do centrôssomo e progressão por meio de citocinas.	-19,84	[0; 1,22]
CCCGTTCTCC	Calm3	of enzymes and other proteins by Ca(2+). Está entre as enzimas a serem estimuladas pelo complexo calmodulin-Ca(2+) e várias proteínas fosfatases e quinases. Junto à CEP110 e centrina, está envolvida em uma via genética que regula o ciclo do centrôssomo e progressão por meio de citocinas.	-3,04	[-8,09; -1,38]
ATTTGAAATA	Gnai2	Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	3,36	[1,38; 10,11]
TCACACATAT	Gng10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	7,90	[1,44; 3,40 ³⁸]
AAGCCTTGCT	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2: Proteína adaptadora que proporciona uma ligação crítica entre o fator de crescimento ligado a superfície celular e a via de sinalização Ras.	-3,29	[-11,5; -1,17]
TATGAGAATG	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-9,92	[0; 2,57]
TAACGCCCTT	Mapk3	Mitogen-activated protein kinase 3	-3,65	[-11,5; -1,5]
CTGCCGCCTC	Parp1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	-9,92	[0; 2,57]
CTGAGCAGTG	Rela	v-rel reticuloendoteliosis viral oncogene homolog A (avian)	-19,84	[0; 1,22]
GCCCAGGTGT	Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	-3,04	[-10,11; -1,08]
CCTGCAGTTT	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	-9,92	[0; 2,57]

FC = taxa de alteração. Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo VEH + NAI em relação ao grupo VEH + FST.

Além da modulação dos mecanismos relacionados à apoptose-proliferação celular entre os animais submetidos ao estresse houve também a indução da expressão de uma série de genes relacionados a processos fisiológicos ligados a remodelagem de citoesqueleto e de neurofilamentos (Figura 7, A e B; Tabela 4). A extensa modulação de genes envolvidos em processos dendríticos, remodelagem de matriz celular e sinalização de ciclo celular, simultaneamente a sinalizadores de estresse parece estar congruente com a hipótese que envolve a plasticidade sináptica e remodelagem hipocampal na consolidação das alterações estruturais responsáveis pela instalação e/ou manutenção das respostas comportamentais associadas ao estresse.

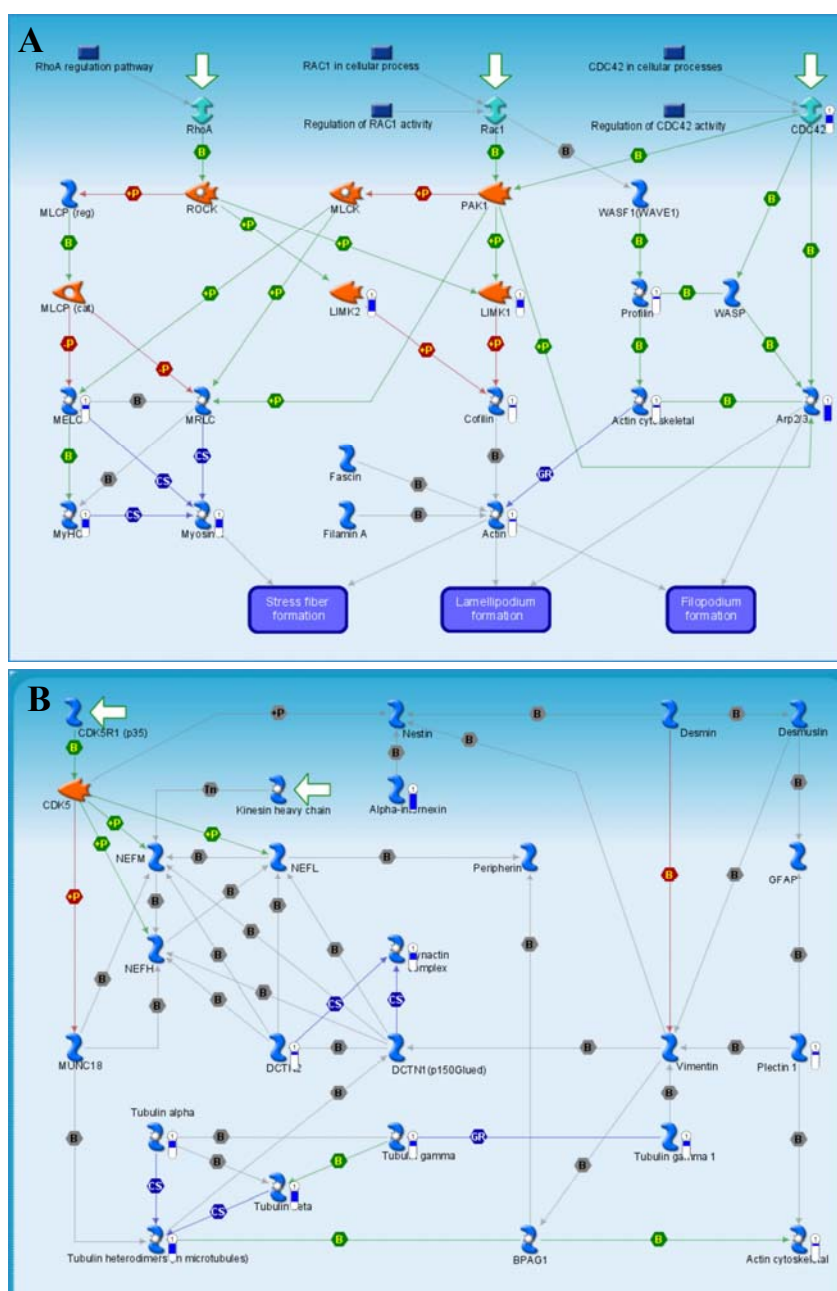


Figura 7. Genes envolvidos com o processo fisiológico de Remodelagem de citoesqueleto (A) e de Neurofilamentos (B) segundo banco de dados GeneGo. Colunas marcadas pelo número 1 indicam a taxa de alteração para os genes diferentemente expressos. As colunas marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH+FST. Colunas em vermelho indicam a taxa de aumento de expressão no grupo VEH+NAI.

Tabela 4: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH + FST e VEH + NAI para os processos fisiológico ligados Remodelagem de citoesqueleto e de neurofilamentos, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
Remodelagem de citoesqueleto por Rho GTPase				
CCCTGAGTCC	Actb	Actin, cytoplasmic 1	-2,08	[-3,55; -1,22]
AAGAAAAGTG	Actr3	Actin-related protein 3	2,33	[1,17; 4,88]
GTGGTGAGGA	Arpc1a	Actin related protein 2/3 complex, subunit 1A	-2,53	[-6,69; -1,04]
GCCTCTCAAT	Arpc5	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	-19,84	[0; 1,22]
TGGGTAGGTG	Cdc42	Cell division control protein 42 homolog	-9,92	[0; 2,57]
GAAGCAGGAC	Cfl1	Cofilin-1	-1,47	[-1,86; -1,17]
GAAGAGAATC	Link1	LIM domain kinase 1	-9,92	[0; 2,57]
AGGCAGACTA	Link2	LIM domain kinase 2	-14,88	[0; 1,7]
CTCCAGACAC	Myh14	Myosin, heavy polypeptide 14	-9,92	[0; 2,57]
AGGACAGCAA	Myl6	similar to myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	-3,72	[-10,11; -1,63]
GGCTGGGGGC	Pfn1	Profilin1	-1,7	[-2,7; -1,08]
Remodelagem de neurofilamentos				
CCCTGAGTCC	Actb	Actin, cytoplasmic 1	-2,08	[-3,55; -1,22]
TGCTTGATC	Actr10	ARP10 actin-related protein 10 homolog	-9,92	[0; 2,57]
TCCTCAGCAC	Capzb	F-actin-capping protein subunit beta	-4,56	[-32,33; -1,22]
CCAGCTCTTG	Dctn2	Dynactin subunit 2	-3,38	[-15,67; -1,08]
ATGCTTCTAC	Ina	Alpha-internexin	-24,8	[0; 1,04]
GGCGGGGGCC	Plec1	Plectin-1	-3,55	[-11,5; -1,33]
GCTTGCTGCC	Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain	-9,92	[0; 2,57]
CCCTCGCCCG	Tubb2c	Tubulin beta-2C chain	-9,92	[0; 2,57]
GACTCCGTCC	Tubb	Tubulin, beta 4	-9,92	[0; 2,57]
GGGATTGTG	Tubb5	Tubulin beta-5 chain	-14,88	[0; 1,7]
CACGTCTGT	Tubg1	Tubulin gamma-1 chain	-6,08	[-99; -1,08]

FC = taxa de alteração. Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo VEH + NAI em relação ao grupo VEH + FST.

Para verificar possíveis mecanismos pelos quais a modulação gênica por drogas antidepressivas previne as consequências do estresse, foi realizada a análise de enriquecimento de processos fisiológicos com base nos genes identificados como diferentemente expressos entre os grupos submetidos ao estresse do FST e tratado com veículo em relação aos animais previamente tratados com o 7NI ou imipramina, e também submetidos ao estresse de FST.

A análise de enriquecimento para o grupo tratado com 7NI acusou mais uma vez que os processos associados à oxidação fosforilativa, remodelagem de citoesqueleto sinalizada por proteína quinase de adesão focal (FAK) e adesão celular estiveram preferencialmente modulados. Contudo, o tratamento com 7NI aparentemente também promoveu a modulação de genes relacionados ao fator de transcrição CREB a fatores de transcrição responsivos a sinalização beta adrenérgica (Tabela 5).

Tabela 5: Processos biológicos modulados segundo análise de enriquecimento pelo método MetaCore, para os genes diferencialmente expressos entre os grupos VEH + FST e 7NI + FST.

Principais mapas de vias GeneGo	N genes	P
Fosforilação oxidativa	22	2,284 ⁻⁰⁸
Fatores de transcrição associados a receptores beta adrenérgicos	10	4,013 ⁻⁰⁷
Adesão celular	17	2,050 ⁻⁰⁶
Remodelagem de citoesqueleto sinalizada por FAK	12	3,974 ⁻⁰⁶
Transcrição induzida pela via CREB	9	1,247 ⁻⁰⁵

Curiosamente, o tratamento com 7NI reverteu a indução da expressão de grande parte dos genes relacionados ao complexo respiratório I, succinato desidrogenase, complexo respiratório III, ATPases. Além de ter inibido a indução das subunidades 6 e 8 do complexo citocromo, o 7NI induziu a expressão da subunidade 8a do Cox (Figura 8, Tabela 6). Estes resultados apontam para um possível efeito do tratamento com o 7NI sobre a redução do estresse metabólico/oxidativo induzido pelo estresse comportamental.

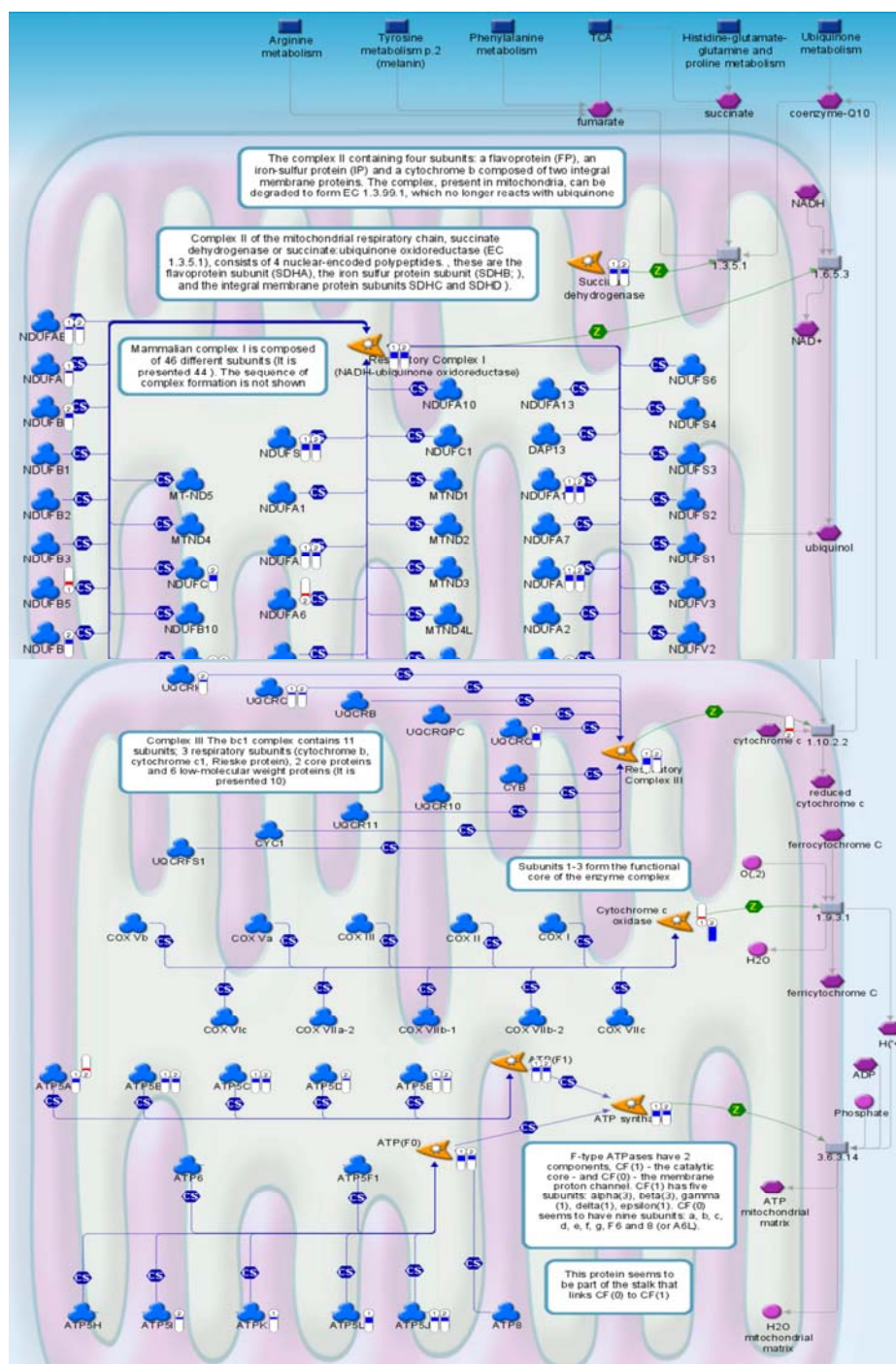


Figura 8. Genes envolvidos com o processo fisiológico de Fosforilação oxidativa segundo banco de dados GeneGo. Colunas marcadas pelos números 1 e 2 indicam a taxa de alteração para os genes diferentemente expressos. As colunas de número 1 marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo 7NI+FST, e em vermelho, indicam a taxa de aumento de expressão no grupo VEH+FST. As colunas de número 2 marcados em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH+FST e em vermelho indicam a taxa de aumento de expressão no grupo VEH+NAI.

Tabela 6: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH + FST e 7NI + FST para os processos fisiológico ligados a Fosforilação oxidativa, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
AGAACTGCAG	Sdhib	Sucinato desidrogenase (ubiquinona) subunidade íon-enxofre,	-9,9	[0; 2,45]
TATGAGGAAG	Sdhc	mitochondrial.	-9,9	[0; 2,45]
TAGACACAGC	Ndufa11	NADH desidrogenase (ubiquinona) 1 alfa subunidade 11, 5, 2 e	-14,88	[0; 1,7]
GGCATAATTA	Ndufa3	Fe-S: catalisa o primeiro passo na cadeia respiratória mitocondrial,	-9,92	[0; 2,57]
TTGATTTTTT	Ndufa4	na qual transfere o elétron do NADH para a ubiquinona (coenzima	-1,9	[-3,55; -1,04]
TTACTGACTT	Ndufa5		-14,88	[0; 1,7]
ATGGCATCGT	Ndufab1	Q) em decorrência da translocação dos prótons pela crista	-2,27	[-4; -1,38]
ATGGGGAGGC	Ndufb11	mitochondrial.	-14,88	[0; 1,7]
GCAAGAGACT	Ndufb5		5,91	[1,04; 99]
CCATCATCTG	Ndufb8		-9,9	[0; 2,45]
GCCCGGCCG	Ndufb9		-9,9	[0; 2,45]
AGGAGTTGCT	Ndufs5		-14,88	[0; 1,7]
ATCAAGGTGG	Cox8a	Cytochrome c oxidase, subunit VIIa	3,28	[1,04; 13,29]
TTCTGGCTGC	Uqcr1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	-1,95	[-4; -1,04]
TATCCAAGTC	Uqcr2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	-19,84	[0; 1,22]
TGATTTCTGT	Atp5a1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	-9,90	[0; 2,45]
GGAAAGCTGG	Atp5b	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	-9,90	[0; 2,45]
TTCTCAGCAG	Atp5c1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	-9,90	[0; 2,45]
TGGGCACCTG	Atp5e	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial	-1,42	[-1,94; -1,04]
GTTGAGTCTG	Atp5j	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	-9,90	[0; 2,45]
GCCGAGTGTA	Atp5j2	similar to ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2	-2,24	[-4; -1,33]
GTCCAAGATA	Atp5I	Similar to CG6105-PA	-14,88	[0; 1,7]

FC = taxa de alteração da expressão gênica. Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo 7NI + FST em relação ao grupo VEH + FST.

Ao que tange a remodelagem de citoesqueleto sinalizada por FKA e adesão celular, efeito semelhante pode ser observado ao da fosforilação oxidativa. Isto é, o tratamento com 7NI reverteu parte dos genes que tiveram sua expressão induzida pelo estresse comportamental do nado forçado. Dentre os genes modulados pelo 7NI estão a proteínas G(o), CDC42, LIMK1, dentre outros. No entanto, o tratamento com 7NI também promoveu a indução da expressão da actina beta e actina de citoesqueleto (Tabela 7, Figura 9). Estes resultados sugerem que o tratamento crônico com 7NI previne, ao menos em parte, as alterações plásticas induzidas pelo estresse.

Tabela 7: Genes diferentemente expressos entre os grupos 7NI + FST e VEH + FST para os processos fisiológicos ligados Remodelagem de citoesqueleto sinalizada por FKA e de Adesão celular, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
Remodelagem de citoesqueleto sinalizada por FKA				
GGCTCCAGTC	Bcar1	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1	-29,76	[0; 0,79]
CACTTATAAA	Calm1	Calmodulin	5,91	[1,04; 99]
CTGCCTTAAT	Cend3	G1/S-specific cyclin-D3	19,84	[0; 1,22]
TGGAAACCAC	Cdc42	Cell division control protein 42 homolog	-9,90	[0; 2,45]
AAGCCTTGCT	Grb2	growth factor receptor bound protein 2	-2,64	[-8,09; -1,04]
TATGAGAATG	Mapk1	Mitogen activated protein kinase 1	-9,90	[0; 2,45]
CTCAGAGGTC	Pak1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	-2,10	[-4; -1,17]
ACGTTTCTTC	Plcb1	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-1	-4,06	[-24; -1,08]
AAGGCTGAAA	Plcb4	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4	-9,90	[0; 2,45]
GTTTTGATTC	Ptk2	Focal adhesion kinase 1	-9,90	[0; 2,45]
TTCTAGCAGA	Sos2	Son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	-9,90	[0; 2,45]
TGGTTTCATT	Traf3	Tnf receptor-associated factor 3 (predicted)	-9,90	[0; 2,45]
Adesão celular				
GCTTTATTGT	Actb	Actin, cytoplasmic 1	2,58	[1,38; 5,25]
TGCCTTGTC	Actn4	Alpha-actinin-4	-9,90	[0; 2,45]
GTGGTGAGGA	Arpc1a	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	-3,05	[-9; -1,22]
GGCTCCAGTC	Bcar1	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1	-29,76	[0; 0,79]
TGGGTAGGTG	Cdc42	Cell division control protein 42 homolog	-9,90	[0; 2,45]
ACCTTTGGCC	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 1	-9,90	[0; 2,45]
TTCAGCAGCA	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	-14,88	[0; 1,7]
GCTGTGGCCA	Gnb4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	29,03	[1,22; 3,40 ³⁸]
AAGCCTTGCT	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	-2,64	[-8,09; -1,04]
GAAGGTTTTA	Jun	Transcription factor AP-1	-9,90	[0; 2,45]
GAAGAGAATC	Limk1	LIM domain kinase 1	-9,90	[0; 2,45]
TATGAGAATG	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-9,90	[0; 2,45]
CTCAGAGGTC	Pak1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	-2,10	[-4; -1,17]
GTTTTGATTC	Ptk2	Focal adhesion kinase 1	-9,90	[0; 2,45]
GCGTCGCTGA	RGD1564327	Integrin alpha 8	-9,90	[0; 2,45]
TGTTCACTAA	Serpine2	Glia-derived nexin	-19,84	[0; 1,22]
TTCTAGCAGA	Sos2	Son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	-9,90	[0; 2,45]

FC = taxa de alteração. Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo 7NI + FST em relação ao grupo VEH + FST.

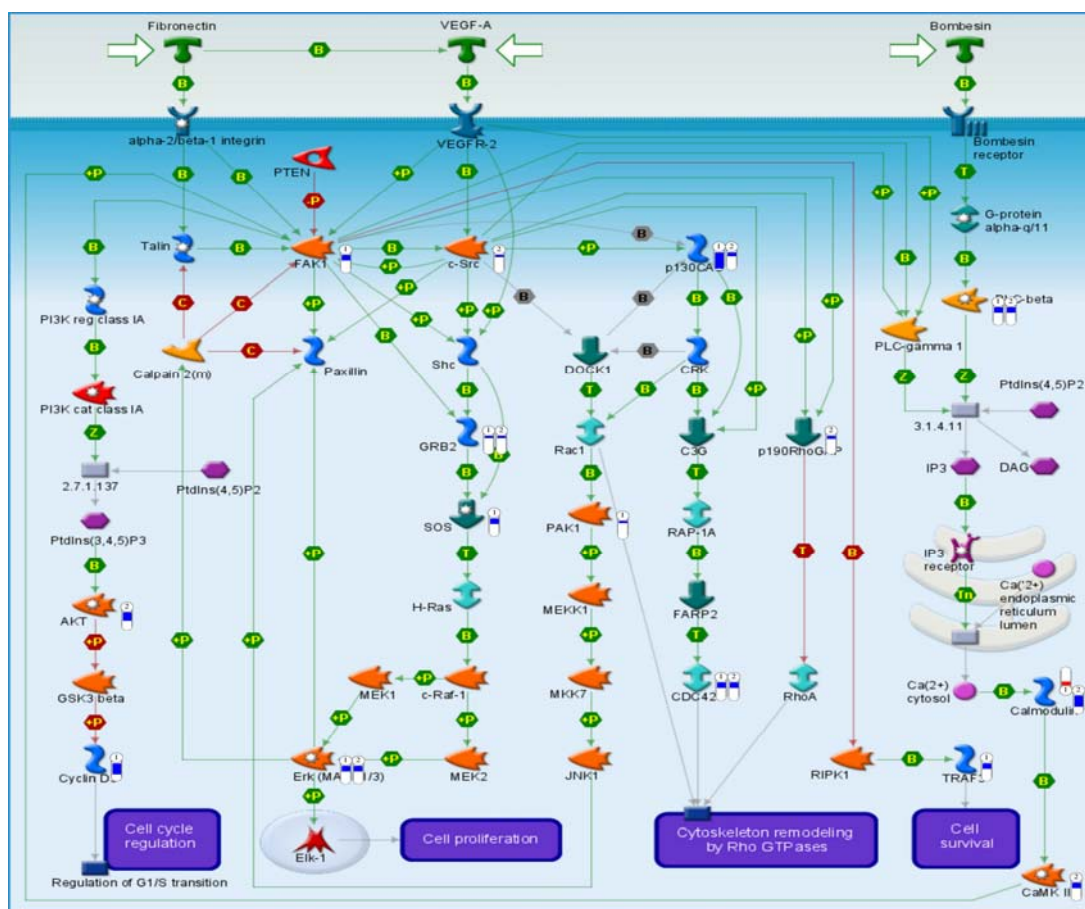


Figura 9. Genes envolvidos com o processo fisiológico de remodelagem de citoesqueleto sinalizado por FAK segundo banco de dados GeneGo. As colunas de número 1 marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo 7NI + FST, e em vermelho indicam a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + FST. As colunas de número 2 marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH + FST, e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + NAI.

No que se refere às funções fisiológicas sinalizadas pela proteína CREB e receptores beta-adrenérgicos, o que chama a atenção é que o tratamento com 7NI reprime a o aumento da expressão de canais de cálcio ao mesmo tempo em que induz a expressão da calmodulina 1 (calm1). Por sua vez, a Calm1 poderia estar potencializando a função do fator de transcrição CREB, via a calmodulina kinase II ou IV (CaMKII – lembrando que no caso do 7NI os níveis de CaMKII se situam nos níveis normais, isto é igual ao grupo naïve veículo, e o 7NI reprimiu a expressão do inibidor da CaMKIV e PP2A), ao mesmo tempo em que a ativação deste fator pelas vias cPKC-ERK1/2 ou adenilato ciclase-PKA estariam inibidas. No que tange aos fatores de transcrição associados à sinalização beta adrenérgica, aparentemente o 7NI, além de prevenir a indução da expressão da proteína Erk (MAPK1/3), inibiu a expressão dos fatores de transcrição c-Jun, c-Fos e AP-1. Assim, se interpretados em conjunto, a modulação da via Calm1-CaMKII/CaMKIV juntamente com a inibição dos fatores de transcrição c-Jun, c-Fos e AP-1, associados à resposta ao estresse, podem ter contribuído para o efeito antidepressivo do 7NI (Figura 10, Tabela 8).

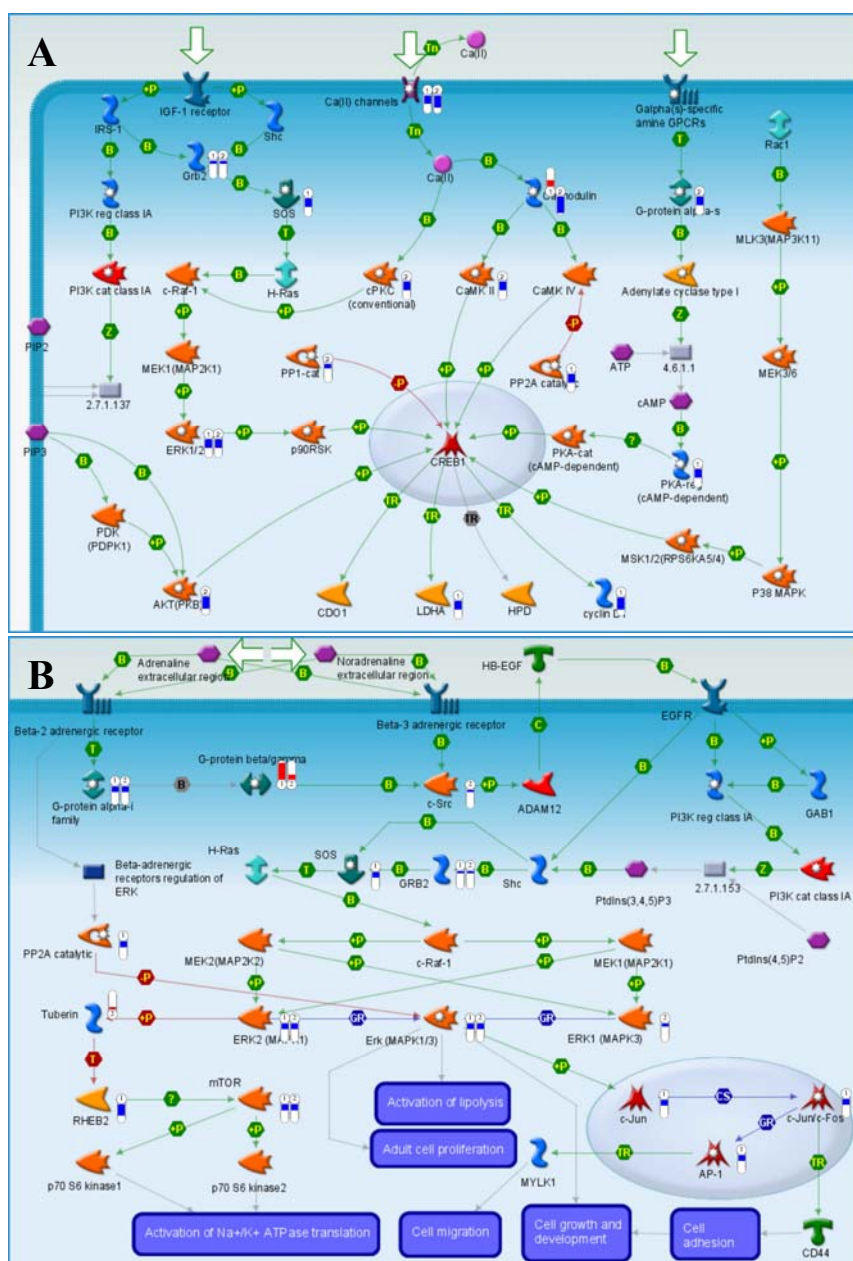


Figura 10. Genes envolvidos com o processo fisiológico ligados a transcrição induzida pela via CREB (A) Fatores de transcrição associados a receptores beta adrenérgicos (B) segundo banco de dados GeneGo. As colunas de número 1 marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo 7NI + FST e em vermelho indicam a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + FST. As colunas de número 2 marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH + FST e em vermelho indicam a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + NAI.

Tabela 8: Genes diferentemente expressos entre os grupos 7NI + FST e VEH + FST para os processos fisiológicos ligados a vias sinalizadas por proteína CREB e vias sinalizadas por receptores beta adrenérgicos, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
Vias sinalizadas por proteína CREB				
AGAAAGAAAA	Cacnb4	Calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	-9,90	[0; 2,45]
CACTTATAAA	Calm1	Calmodulin 1	5,91	[1,04; 99]
GTCCAGGAAA	Ccn1	G1/S-specific cyclin-D1	-14,88	[0; 1,7]
AAGCCTTGCT	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	-2,64	[-8,09; -1,04]
CAGTTGGCAG	Ldha	L-lactate dehydrogenase A chain	-9,90	[0; 2,45]
TATGAGAATG	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-9,90	[0; 2,45]
GATTATAGAG	Ppp2cb	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	-9,90	[0; 2,45]
TCAGGACAGT	Prkar1b	cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit	-9,90	[0; 2,45]
TTCTAGCAGA	Sos2	Son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	-9,90	[0; 2,45]
Vias sinalizadas por receptores beta adrenérgicos				
ATGCTGAACC	Frap1	FKBP12-rapamycin complex-associated protein	-9,90	[0; 2,45]
ACCTTTGGCC	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 1	-9,90	[0; 2,45]
TTCAGCAGCA	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	-14,88	[0; 1,7]
GCTGTGGCCA	Gnb4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	29,32	[1,22; 3,40 ³⁸]
AAGCCTTGCT	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	-2,64	[-8,09; -1,04]
TATGAGAATG	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-9,90	[0; 2,45]
GATTATAGAG	Ppp2cb	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	-9,90	[0; 2,45]
GTGGGGAAAG	Rheb	GTP-binding protein Rheb	-19,84	[0; 1,22]
TTCTAGCAGA	Sos2	Son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	-9,90	[0; 2,45]

FC = taxa de alteração. Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo 7NI + FST em relação ao grupo VEH + FST.

A análise de enriquecimento para os animais tratados com imipramina e submetidos ao FST em relação aos animais tratados com veículo e submetidos ao FST acusou que os processos fisiológicos associados à fosforilação oxidativa, apoptose e/ou proliferação sinalizadas por receptores 5-HT1A, remodelagem de citoesqueleto, controle de transcrição gênica por heterocromatina e processos neurofisiológicos sinalizados por receptores 5-HT1A também foram preferencialmente modulados (Tabela 9).

Tabela 9: Processos biológicos modulados segundo análise de enriquecimento pelo método MetaCore, para os genes diferencialmente expressos entre os grupos VEH+FST e IMI+FST.

Principais mapas de vias GeneGo	N genes	P
Fosforilação oxidativa	36	2,28 ⁻⁸
Apoptose, proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A	18	1,28 ⁻⁷
Remodelagem de citoesqueleto	22	3,78 ⁻⁶
Controle da transcrição gênica por proteínas de heterocromatina 1 (HP1)	11	5,25 ⁻⁶
Processos neurofisiológicos sinalizados por receptores 5-HT1A	14	6,02 ⁻⁶

O tratamento com imipramina aparentemente reverteu a grande maioria da indução gênica relacionados à fosforilação oxidativa. Além disso, promoveu um potente efeito indutor da expressão de genes do complexo da cadeia respiratória I, NADH desidrogenase proteína Fe6 e proteínas do complexo citocromo Cox4i1 e Cox8a (Figura 11).

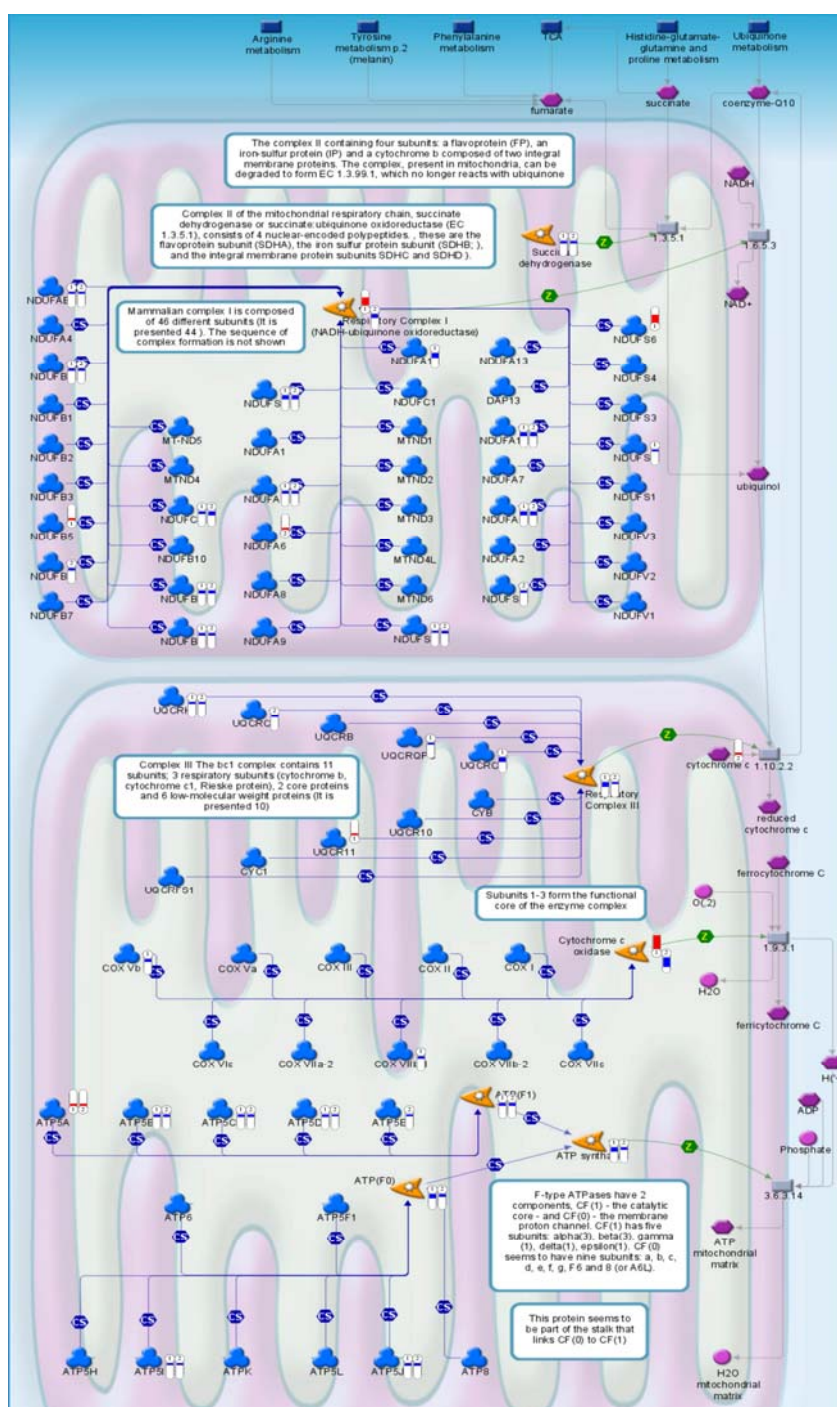


Figura 11. Genes envolvidos com o processo fisiológico de Fosforilação oxidativa segundo banco de dados GeneGo. As colunas de número 1 marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo IMI + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + FST. As colunas de número 2 marcadas em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + NAI.

Tabela 10: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH + FST e IMI + FST para os processos fisiológicos ligados a Fosforilação oxidativa, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
AATAAAAGTT	Atp5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2,21	[1,27; 4]
TGACCTGTGA	Atp5b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	-9,92	[0; 2,45]
TTCTCAGCAG	Atp5c1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	-9,92	[0; 2,45]
ACCTGGCAGG	Atp5	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	-9,92	[0; 2,45]
CCAGTCCTGG	Atp5q1	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial	-4,56	[-9; -2,57]
GAAATATGTG	Atp5g3	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial	-2,43	[-4,26; -1,44]
GCATACGGCG	Atp5i	ATP synthase subunit e, mitochondrial	-1,79	[-3,55; -0,96]
GTTGAGTCTG	Atp5j	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial	-9,92	[0; 2,45]
AACCCAAGTT	Atp5o	ATP synthase subunit O, mitochondrial	-14,88	[0; 1,63]
CTGGAAGCTG	Cox4i1	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	44,44	[1,86; 3,40 ³⁸]
GCTGGCTAGT	Cox5b	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	-9,92	[0; 2,45]
GGCCGCCCCA	Cox6a1	Cytochrome c oxidase polypeptide 6A1, mitochondrial	-4,02	[-24; -1,04]
AGCGCCCAGA	Cox6a2	Cytochrome c oxidase polypeptide 6A2, mitochondrial	-34,72	[0; 0,67]
GAAAGTAGGT	Cox7b	Cytochrome c oxidase polypeptide 7B, mitochondrial	-7,03	[-3,40 ³⁸ ; -1,27]
ACCTCTCGAT	Coxa8	Cytochrome c oxidase polypeptide 8A, mitochondrial	59,26	[2,57; 3,40 ³⁸]
CTTAGTGTTT	LOC679739	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6	34,57	[1,38; 3,40 ³⁸]
AGGGTGCCAT	Ndufa11	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	-14,80	[0; 1,63]
TAGACACAGC	Ndufa10	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 10-like protein	-19,80	[0; 1,17]
GGCATAATTA	Ndufa3	NADH-ubiquinone oxidoreductase B9 subunit (Complex I-B9)	-9,92	[0; 2,45]
TTACTGACTT	Ndufa5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	-14,80	[0; 1,63]
ATGGCATCGT	Ndufab1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1	-1,52	[-2,45; -0,96]
CGCTCGACCT	Ndufb4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 4, 15kDa	-9,92	[0; 2,45]
GCAAGAGACT	Ndufb5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5	4,96	[1,08; 99]
CCATCATCTG	Nbufb8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8	-9,92	[0; 2,45]
AACAGTGCAG	Nbufb9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9	-9,92	[0; 2,45]
AACAGTGCAG	Ndufc2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2	-9,92	[0; 2,45]
TACTAGAAAA	Ndufs2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	-2,81	[-8,09; -1,08]
ACTCAGCAAT	Ndufs5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5b, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	-14,80	[0; 1,63]
GGGAGCTGTG	Ndufs7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	-3,35	[-15,67; -1,08]
AACAAGGAGT	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	-9,92	[0; 2,45]
AGAACTGCAG	Sdhb	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	-9,92	[0; 2,45]
TACCATCTTT	Sdhc	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein	-2,13	[-5,25; -0,96]
TATCCAAGTC	Uqcr	similar to ubiquinol-cytochrome c reductase subunit	2,89	[1,5; 6,14]
TATCCAAGTC	Uqcr2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	-19,80	[0; 1,17]
CAGAGTCGCT	Uqcrh	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial	-1,83	[-3,17; -1,08]
GGGCAACCAG	Uqcrcq	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	-1,56	[-2,57; -0,96]

FC = taxa de alteração da expressão gênica. Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo IMI + FST em relação ao grupo VEH + FST.

Assim como ocorreu para os mecanismos ligados à fosforilação oxidativa, o tratamento com a imipramina aparentemente reverteu grande parte dos genes induzidos pelo estresse do nado forçado, só que agora para os genes ligados ao controle apoptótico-proliferativo sinalizado por receptores 5-HT1A. Chamando a atenção para pelo menos duas vias neste sistema, é possível notar que o tratamento com imipramina reverteu a indução dos fatores de transcrição NF- κ B e STAT3 e do fator regulador da caspase PARP-1. Justos, estes genes atuam provavelmente inibindo o direcionamento pró-apoptótico. Além disso, a redução da expressão das proteínas PPA2 poderia reduzir o fator acelerador de apoptose Bax, com resultado também anti-morte celular. Ainda neste sistema, a imipramina reverteu a indução de ERK1(MAPK3) e ERK2(MAPK1) induzida pelo estresse do nado forçado, e reprimiu a expressão c-Raf-1 e Map2K2. Este efeito pode ser visto como um prejuízo nos mecanismos associados à neuroproteção, mas também é possível que esteja ligada ao fato da imipramina ter prevenido as consequências do estresse comportamental, o que reduziria a necessidade de recrutamento destes mecanismos (Figura 12, Tabela 11).

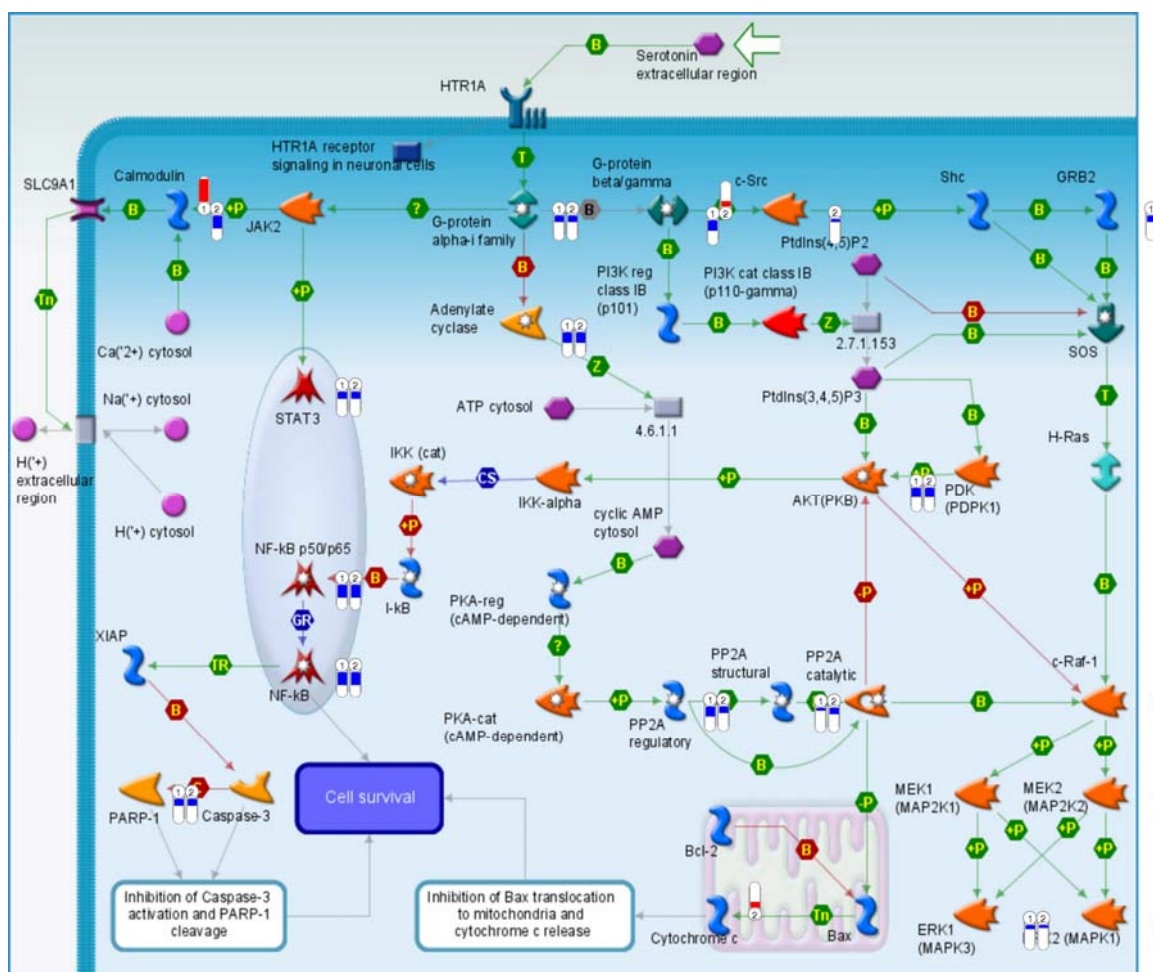


Figura 12. Genes envolvidos com o processo fisiológico de apoptose-proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A segundo banco de dados GeneGo. As colunas de número 1 em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo IMI + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + FST. As colunas de número 2 em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + NAI.

Tabela 11: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH+FST e IMI+FST para os processos fisiológico ligados à apoptose e proliferação sinalizada por receptores 5-HT1A, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
TGTCTCATTG	Adecy2	Adenylate cyclase 2	-14,80	[0; 1,63]
GGCAATATCC	Adecy3	Adenylate cyclase type 3	-14,80	[0; 1,63]
GGGTGCAGCG	Akt2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	-14,80	[0; 1,63]
ACAGTCCCCA	Calm1	Calmodulin	-19,88	[0; 1,17]
ACGAACCTGG	Calm3	Calmodulin	34,56	[1,38; 3,40 ³⁸]
TGCTTTGTAG	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 1	-9,92	[0; 2,45]
TTCAGCAGCA	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	-14,80	[0; 1,63]
ATGTTTAAGG	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	-9,92	[0; 2,45]
CCTTCATCAA	Mak2k2	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	-9,92	[0; 2,45]
TATGAGAATG	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-9,92	[0; 2,45]
TAACGCCCTT	Mapk3	Mitogen-activated protein kinase 3	-6,03	[-24; -2,13]
CTGCCGCCTC	Parp1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	-9,92	[0; 2,45]
TTTTTTTGTG	Ppp2r1a	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65)	-2,57	[-5,67; -1,22]
ACAGTTTACC	Ppp2r4	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B (PR 53) (predicted)	-14,80	[0; 1,63]
AAGTCTTTCT	Ppp2r5	protein phosphatase 2, regulatory subunit B' gamma isoform	-9,92	[0; 2,45]
GAGTCCTGGC	Raf	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	-24,80	[0; 1]
CTGAGCAGTG	Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	-19,88	[0; 1,17]
GCATCCTGCT	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	-9,92	[0; 2,45]

FC = taxa de alteração, Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo IMI + FST em relação ao grupo VEH + FST,

Genes ligados ao controle de citoesqueleto também estão significativamente representados no grupo tratado com imipramina, sendo que boa parte deles a imipramina reverteu a tendência de indução da expressão pelo estresse, Além disso, pelo menos 3 genes, o precursor do ativador de plasminogênio tecidual (PLAT), a actina de citoesqueleto (Actg1) e cabeça pesada de miosina tipo II (MyHC), tiveram sua expressão significativamente aumentada (Figura 13, Tabela 12),

Talvez um dos aspectos mais interessantes a respeito dos efeitos da imipramina sobre a modulação da expressão gênica hipocampal esteja relacionada à família de proteína histona no controle do silenciamento gênico, O tratamento com imipramina promoveu um potente efeito indutor (64 vezes) sobre a família de proteínas 14-3-3, Esta proteína tem papel inibitório sobre a histona deacetilase 9 (HDAC9), que por sua vez inibe por ligação o fator de transcrição Mef2, Assim, pelo mecanismo de inibição do repressor, o aumento da expressão 14-3-3 levaria a um aumento da atividade do Mef2, que por sua vez é descrito como importante indutor da expressão de genes em neurônios relacionados a processos de diferenciação e funções constitutivas, Por outro lado a imipramina reprimiu a expressão em cerca de 14 vezes a expressão da histona deacetilase de classe II, além de reprimir a expressão de histonas H3 em cerca de 19 vezes, Somados, estes efeitos podem estar produzindo um potente efeito contrário a repressão da expressão gênica mediado pela condensação da cromatina, o que poderia resultar na ativação simultânea de um grande número de genes (Figura 14, Tabela 12).

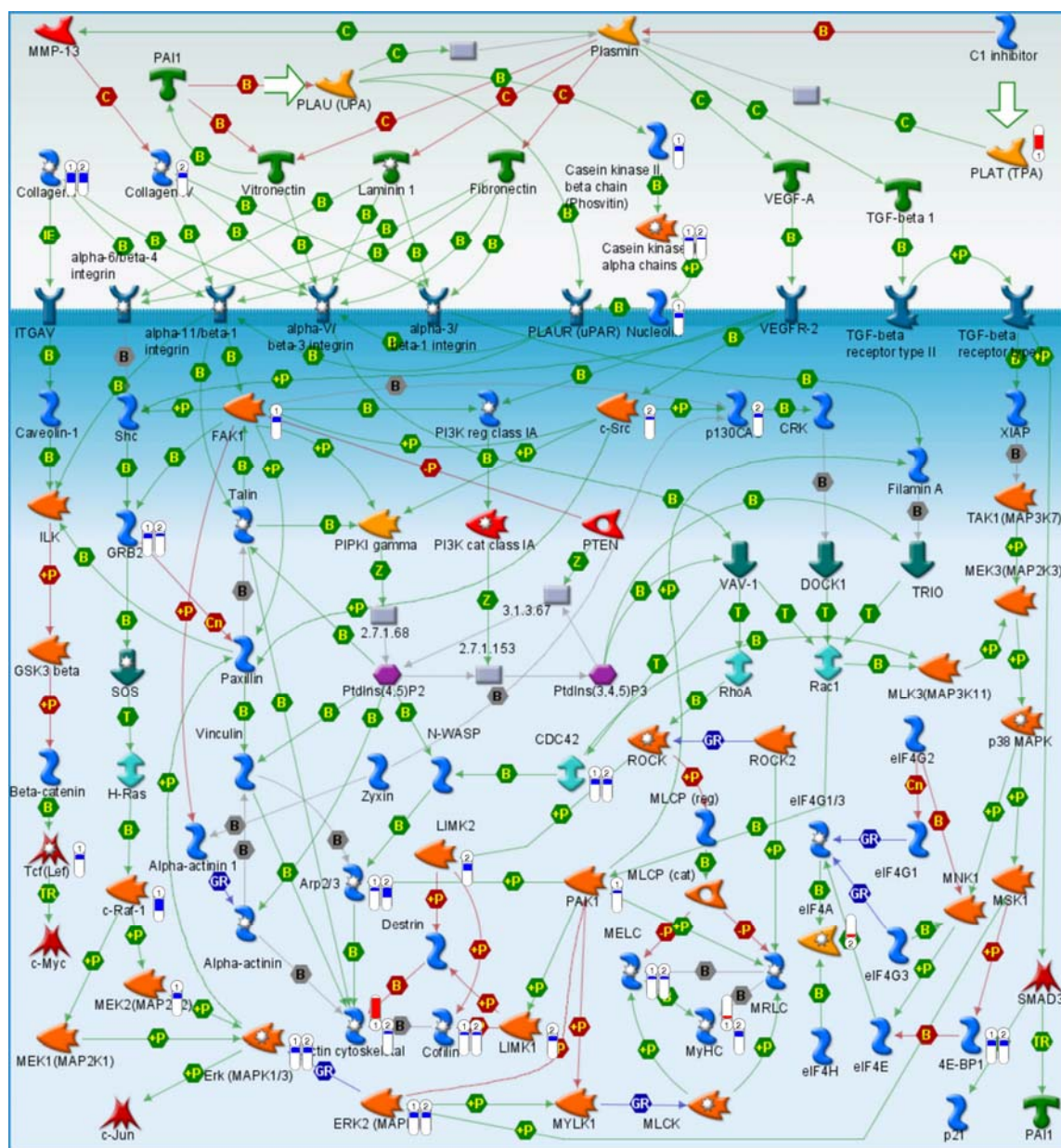


Figura 13. Genes envolvidos com o processo fisiológico de remodelagem de citoesqueleto segundo banco de dados GeneGo. As colunas de número 1 em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo IMI + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + FST. As colunas de número 2 em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + NAI.

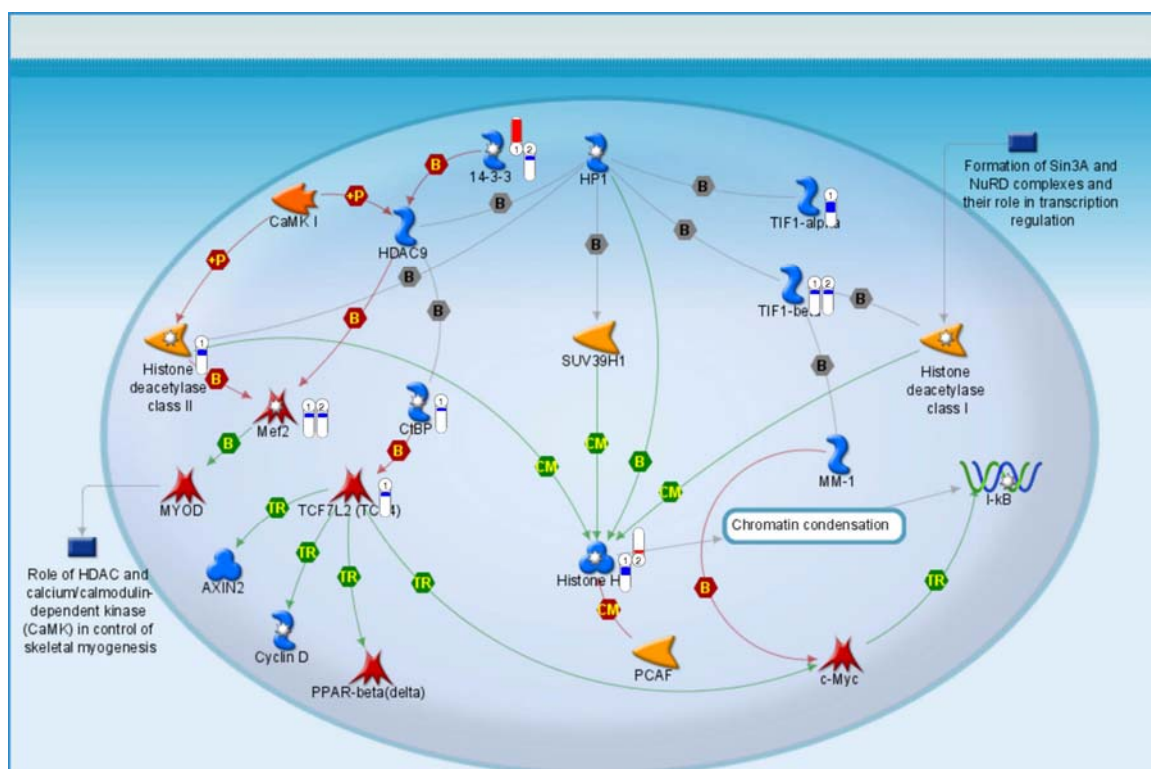


Figura 14. Genes envolvidos com o processo fisiológico de controle da transcrição gênica por proteínas de heterocromatina 1 (HP1) segundo banco de dados GeneGo. As colunas de número 1 em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo IMI + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + FST. As colunas de número 2 em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + NAI.

Tabela 12: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH+FST e IMI+FST para os processos fisiológicos de remodelagem de citoesqueleto e controle da transcrição gênica por proteínas de heterocromatina 1 (HP1), segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95%ci
Remodelagem de citoesqueleto				
CCCTGAGTCC	Actb	Actin, cytoplasmic 1	-1,96	[-3,35; -1,17]
TAGTGATCTG	Actg1	Actin, cytoplasmic 2	44,44	[1,86; 3,40 ³⁸]
GTGGTGAGGA	Arpc1a	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	-3,01	[-9; -1,17]
TGGGTAGGTG	Cdc42	Cell division control protein 42 homolog	-9,92	[0; 2,45]
CTGCCAACTT	Cfl1	Cofilin-1	-1,57	[-1,94; -1,27]
TGCAGGCTGG	Col1a1	Collagen alpha-1(I) chain	-19,80	[0; 1,17]
TGCAGGCTGG	Csnk2k	casein kinase II, alpha 2, polypeptide (predicted)	-19,80	[0; 1,17]
GTGCATCCCG	Csnk2b	Casein kinase II subunit beta	-8,04	[-3,40 ³⁸ ; -1,5]
CAGGCCAGCC	Eif4ebp1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	-9,92	[0; 2,45]
ATGTTTAAGG	Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	-9,92	[0; 2,45]
CCGTTCTGGA	LOC679869	similar to transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box	-9,92	[0; 2,45]
CCTTCATCAA	Map2k2	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	-9,92	[0; 2,45]
TATGAGAATG	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-9,92	[0; 2,45]
TAACGCCCTT	Mapk3	Mitogen-activated protein kinase 3	-3,03	[-24; -2,13]
GAGTGCTCA	My10	Myosin-10	4,98	[1,38; 32,33]
GGGCGGAGCT	Myl6	similar to myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	-2,76	[-6,69; -1,27]
AGGACAGCAA	Myl6b	similar to myosin light chain 1 slow a	-3,68	[-10,11; -1,63]
GAAGATGGAG	Ncl	Nucleolin	-9,92	[0; 2,45]
CTCAGAGGTC	Pak1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	-1,64	[-3; -0,92]
GCCTCCAAGA	Plat	Tissue-type plasminogen activator	29,63	[1,17; 3,40 ³⁸]
GTTTTGATTC	Ptk2	Focal adhesion kinase 1	-9,92	[0; 2,45]
GAGTCCTGGC	Raf1	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	-24,80	[0; 1]
Controle da transcrição gênica por proteínas de heterocromatina 1 (HP1)				
TTTGACTG	Ctbp1	C-terminal-binding protein 1	-2,13	[-5,25; -0,96]
CCCAAAGACA	H3f3	Histone H3,3	-19,80	[0; 1,17]
ACCGTTCTAC	Hdac6	histone deacetylase 6	-14,88	[0; 1,63]
CCGTTCTGGA	loc679869	similar to transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box	-9,92	[0; 2,45]
GTCTGTGGAG	Mef2d	Myocyte-specific enhancer factor 2D	-9,92	[0; 2,45]
TATAATGGCA	Trim24	Ab2-427	-29,70	[0; 0,79]
CTTGTCACA	Trim28	Transcription intermediary factor 1-beta	-9,92	[0; 2,45]
TTATGCAGTG	Ywhag	14-3-3 protein epsilon	64,19	[2,85; 3,40 ³⁸]
ATGGGTGGTT	Ywhah	14-3-3 protein eta	1,33	[1; 1,7]
ATGATCCGGT	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	-14,88	[0; 1,63]

FC = taxa de alteração, Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo IMI + FST em relação ao grupo VEH + FST,

Outro fato interessante está relacionado aos processos biológicos que associam a atividade do receptor 5-HT_{1A} à atividade neuronal. O tratamento com a imipramina aparentemente promoveu uma troca no tipo de subunidade de receptor AMPA. A subunidade Gria2 estaria cerca de 14 vezes mais expresso nos animais tratados com veículo e submetidos ao FST, enquanto o tratamento com imipramina induziu a expressão da subunidade Gria3 em pouco mais de 3 vezes. Além disso, a imipramina reduziu a expressão do canal de potássio dependente de proteína G (Kcnj5). O aumento da expressão de receptores AMPA pode estar relacionado à redução de LTP, enquanto a redução da expressão dos canais de potássio pode estar relacionada ao aumento da excitabilidade neuronal e aumento da liberação de neurotransmissores (de forma independente do influxo de cálcio). O tratamento crônico com imipramina também promoveu repressão da expressão de proteína G-beta/gama. Efeito que ocorreu em direção oposta ao observado nos animais veículo, naïve. Uma vez que esta proteína G está na via sinalizadora do receptor 5-HT_{1A}, especula-se que a maior disponibilidade de serotonina mediante o tratamento com a imipramina possa ter promovido uma adaptação na função dessa proteína, com reflexo sobre a expressão dos canais de potássio dependentes de proteína G, bem como refletindo na inibição da expressão do c-Raf-1 e MEK2 (MAP2K) (Figura 15, Tabela 13).

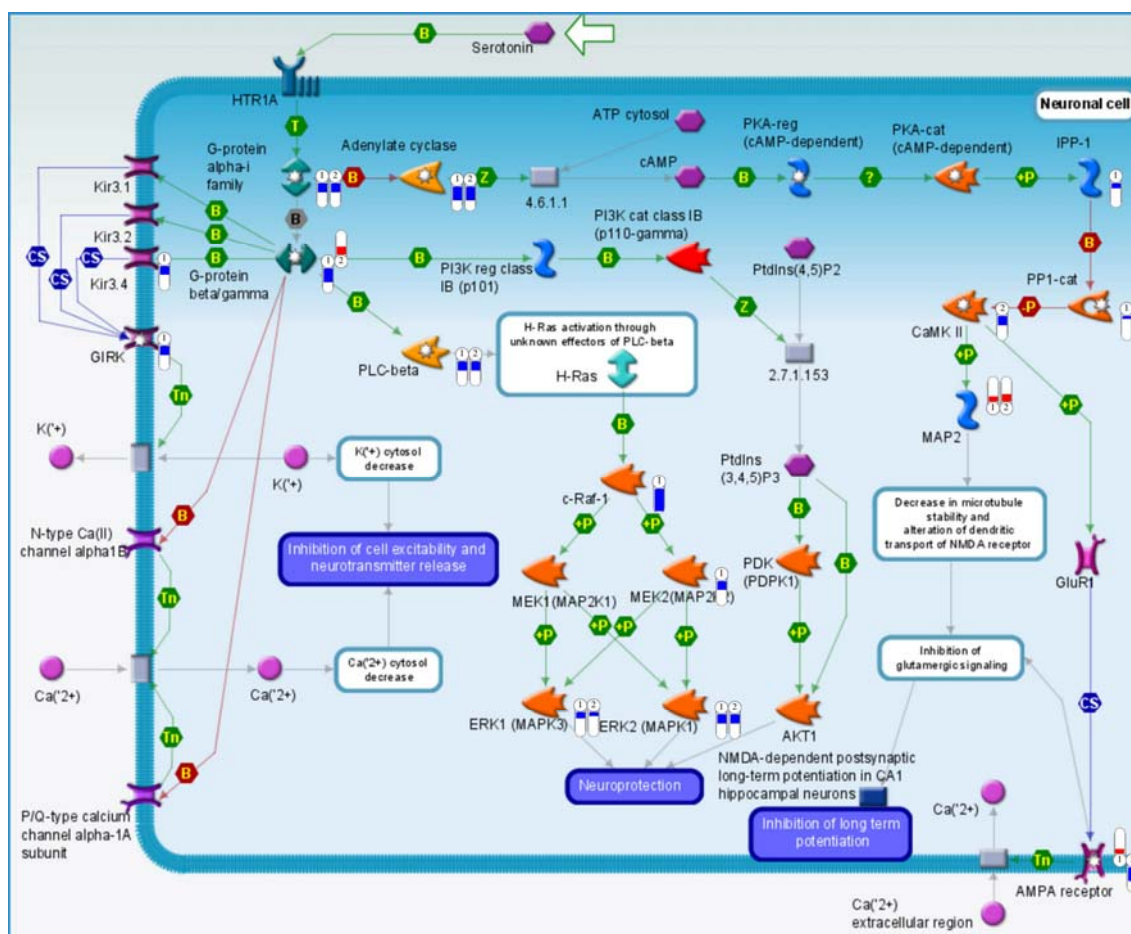


Figura 15. Genes envolvidos com os processos neurofisiológicos ligados a sinalização de receptor 5-HT1A segundo banco de dados GeneGo. As colunas de número 1 em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo IMI + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + FST. As colunas de número 2 em azul indicam a taxa de aumento da expressão no grupo VEH + FST e em vermelho a taxa de aumento de expressão no grupo VEH + NAI.

Tabela 13: Genes diferentemente expressos entre os grupos VEH+FST e IMI+FST para os processos neurofisiológicos ligados à sinalização por receptor 5-HT1A, segundo classificação GeneGo.

TAG	Símbolo	Descrição: Função	FC	95% ci
TGTCTCATTG	Adcy2	Adenylate cyclase type 2	-14,88	[0; 1,63]
GGCAATATCC	Adcy3	Adenylate cyclase type 3	-14,88	[0; 1,63]
TGCTTTGTAG	Gnao1	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha 1	-9,92	[0; 2,45]
TTCAGCAGCA	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-1	-14,88	[0; 1,63]
AGGTATTGTA	Gria3	Glutamate receptor 3	3,98	[1,04; 24]
TTGTGATGAC	Kcnj5	G protein-activated inward rectifier potassium channel 4	-9,92	[0; 2,45]
TTTTTCAATC	Map2	Microtubule-associated protein 2	5,47	[1,5; 32,33]
CCTTCATCAA	Map2k2	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	-9,92	[0; 2,45]
TATGAGAATG	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-9,92	[0; 2,45]
TAACGCCCTT	Mapk3	Mitogen-activated protein kinase 3	6,03	[-24; -2,13]
AAGGCTGAAA	Plc	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-4	-9,92	[0; 2,45]
GCTGGCAGCC	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	-1,56	[-2,57; -0,96]
GACACTGGAT	Ppp1r1a	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1A	-5,63	[-15,67; -2,33]
GAGTCCTGGC	Raf1	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	-24,80	[0; 1]

FC = taxa de alteração. Os valores indicam quantas vezes o gene está +/- expresso no grupo IMI + FST em relação ao grupo VEH + FST.

Por fim, com o objetivo de avaliar se os efeitos do tratamento farmacológico sobre os grupos gênicos enriquecidos segundo as classes de funcionalidade não teriam decorrido de um efeito inespecífico da droga, a análise de enriquecimento de funções gênicas também foi realizada para o grupo dos animais tratados com veículo e não submetidos ao modelo do nado forçado em relação àqueles tratados com 7NI, mas também não submetidos ao modelo do nado forçado. Por esta análise, o banco de dados MetaCore acusou que haveria enriquecimento da modulação de genes associados principalmente a remodelagem de citoesqueleto e adesão celular. Não foi detectada associação significativa para as funções de fosforilação oxidativa, sinalização mediada por proteína CREB e as vias sinalizadas por receptores 5-HT1A ou beta adrenérgicos, as quais estavam evidentes para os animais submetidos ao estresse e/ou tratados com 7NI ou IMI (Tabela 14).

Tabela 14: Processos biológicos modulados segundo análise de enriquecimento pelo método MetaCore para os genes diferencialmente expressos entre os grupos VEH + NAI e 7NI + NAI.

Principais mapas de vias GeneGo	N genes	P
Remodelagem de citoesqueleto	41	$4,63^{-14}$
Remodelagem de citoesqueleto ligados a TGF e WNT	41	$1,30^{-12}$
Adesão celular	36	$7,37^{-11}$
Remodelagem de citoesqueleto sinalizada por PKA	20	$1,52^{-09}$
Remodelagem de citoesqueleto sinalizada por integrinas	20	$1,15^{-07}$

4.3. Resultados obtidos para a biblioteca proteômica

Foram construídos géis 2DE para as amostras de proteínas dos grupos VEH + NAI, 7NI + NAI, VEH + FST, 7NI + FST e IMI + FST em triplicata, Os spots foram identificados por meio do programa ImageMaster e reavaliados manualmente, Em seguida, realizou-se teste de reprodutibilidade entre os géis, Foram selecionados 2 géis para cada grupo experimental, que tiveram identidade superior a 95% (Figuras 16, 17, 18, 19 e 20 respectivamente).

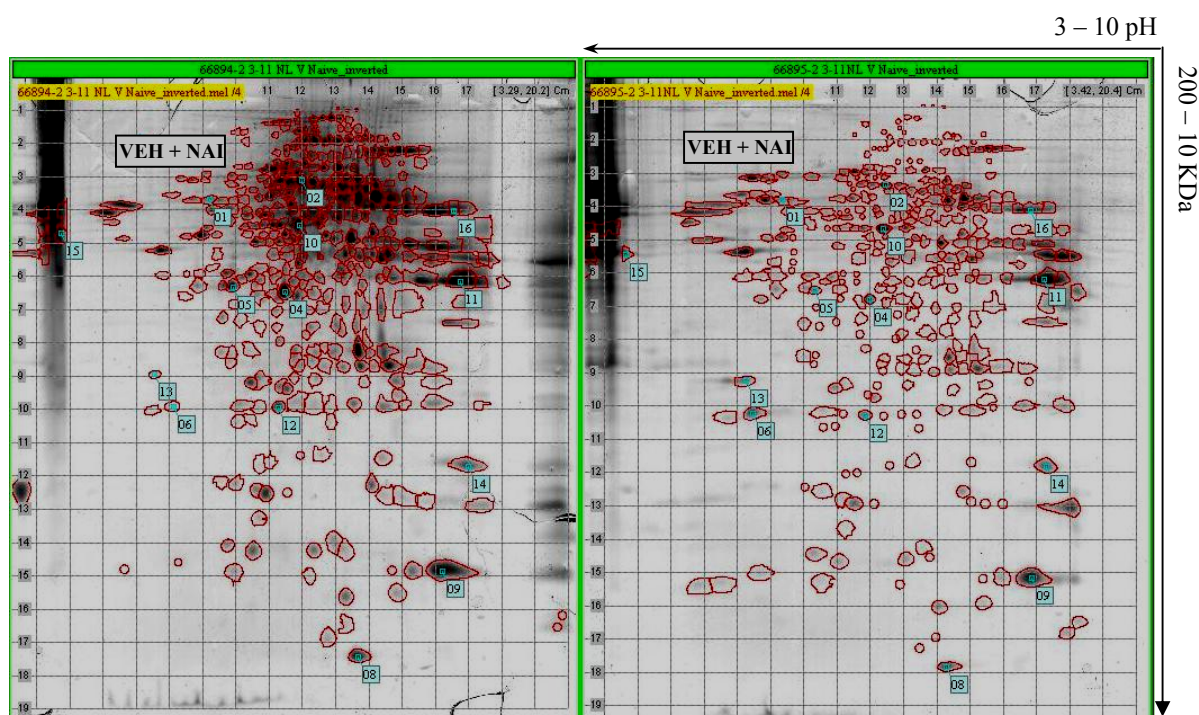


Figura 16. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com veículo. Spots de proteínas estão circulado em vermelho. Na horizontal está indicada a focalização isoelétrica, e na vertical a migração por peso molecular. Os números de 1 a 15 marcam os spots de referência nas duplicatas.

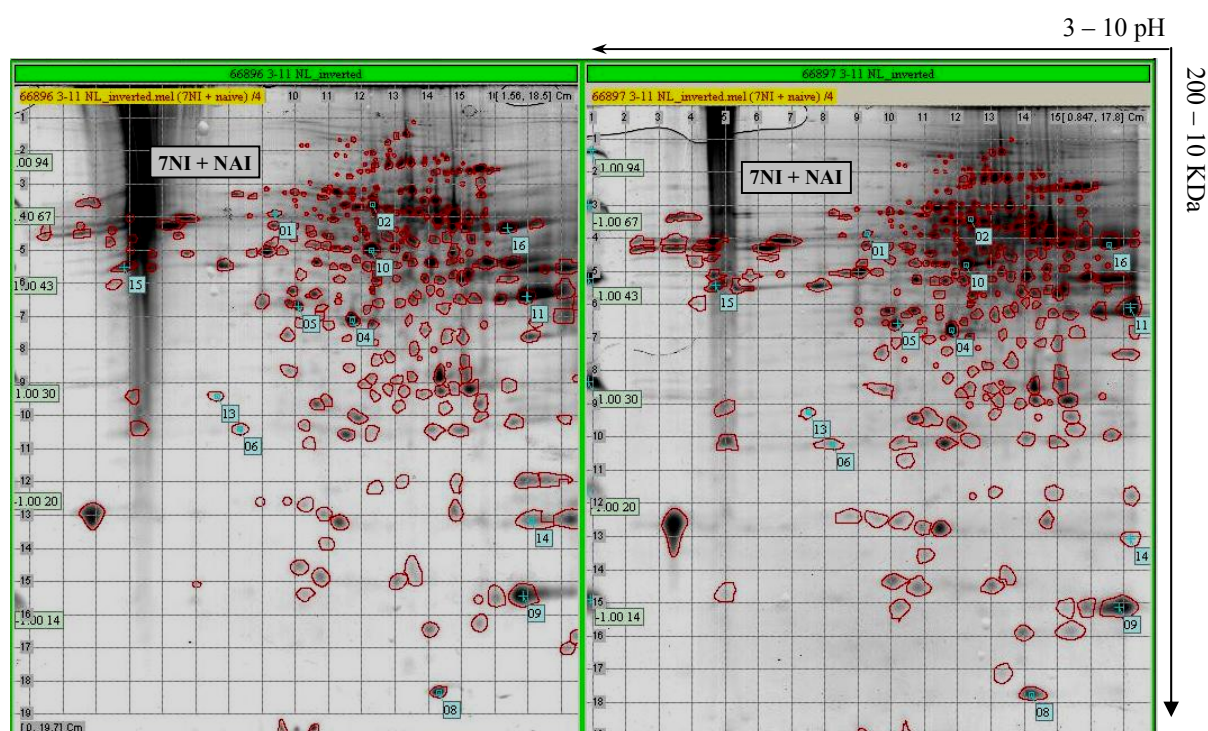


Figura 17. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com 7NI. *Spots* de proteínas estão circulado em vermelho. Na horizontal está indicada a focalização isoeétrica e na vertical a migração por peso molecular. Os números de 1 a 15 marcam os *spots* de referência nas duplicatas.

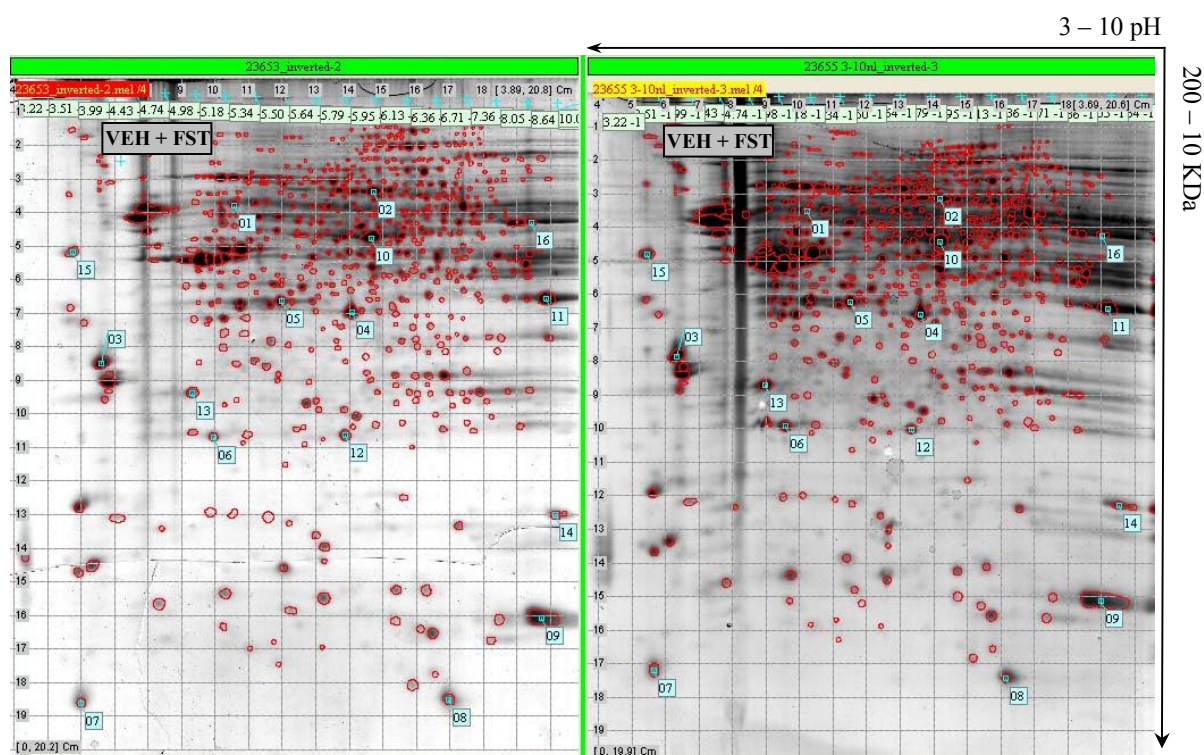


Figura 18. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com veículo e avaliados no modelo comportamental do nado forçado. *Spots* de proteínas estão circulado em vermelho. Na horizontal está indicada a focalização isoeletrica, e na vertical a migração por peso molecular. Os números de 1 a 15 marcam os *spots* de referência nas duplicatas.

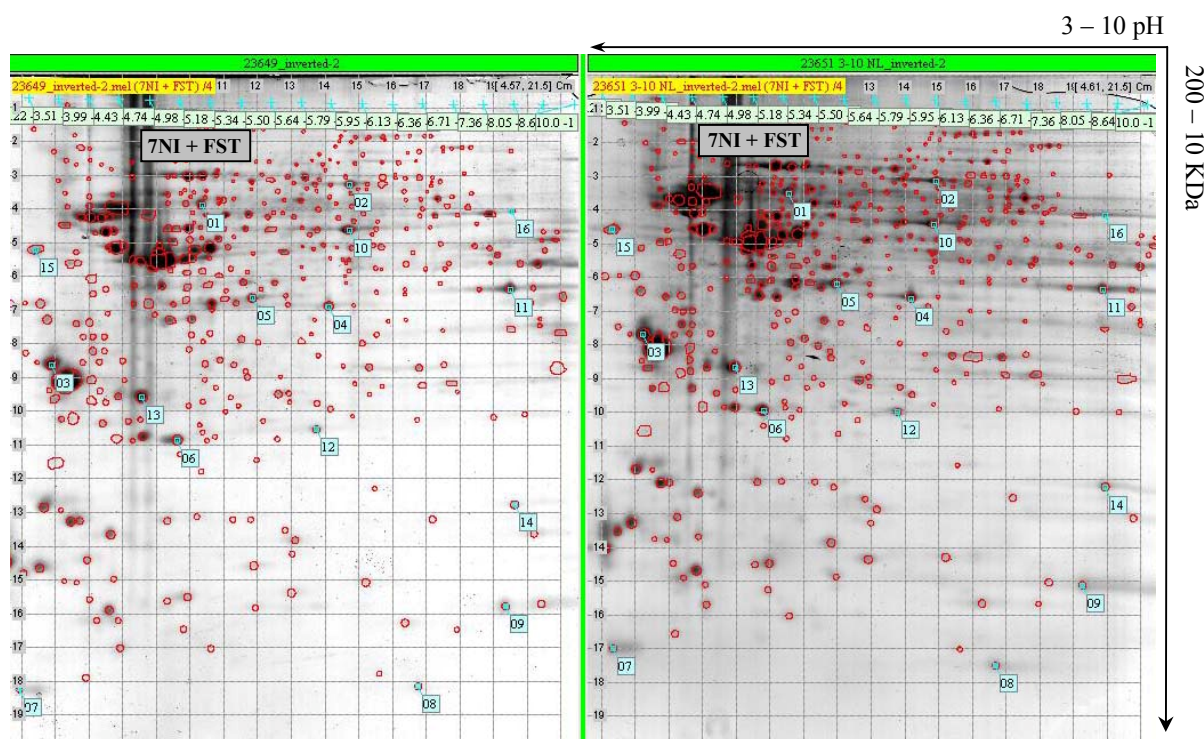


Figura 19. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com 7-NI e avaliados no modelo comportamental do nado forçado. *Spots* de proteínas estão circulado em vermelho. Na horizontal está indicada a focalização isoeletrica e na vertical a migração por peso molecular. Os números de 1 a 15 marcam os *spots* de referência nas duplicatas.

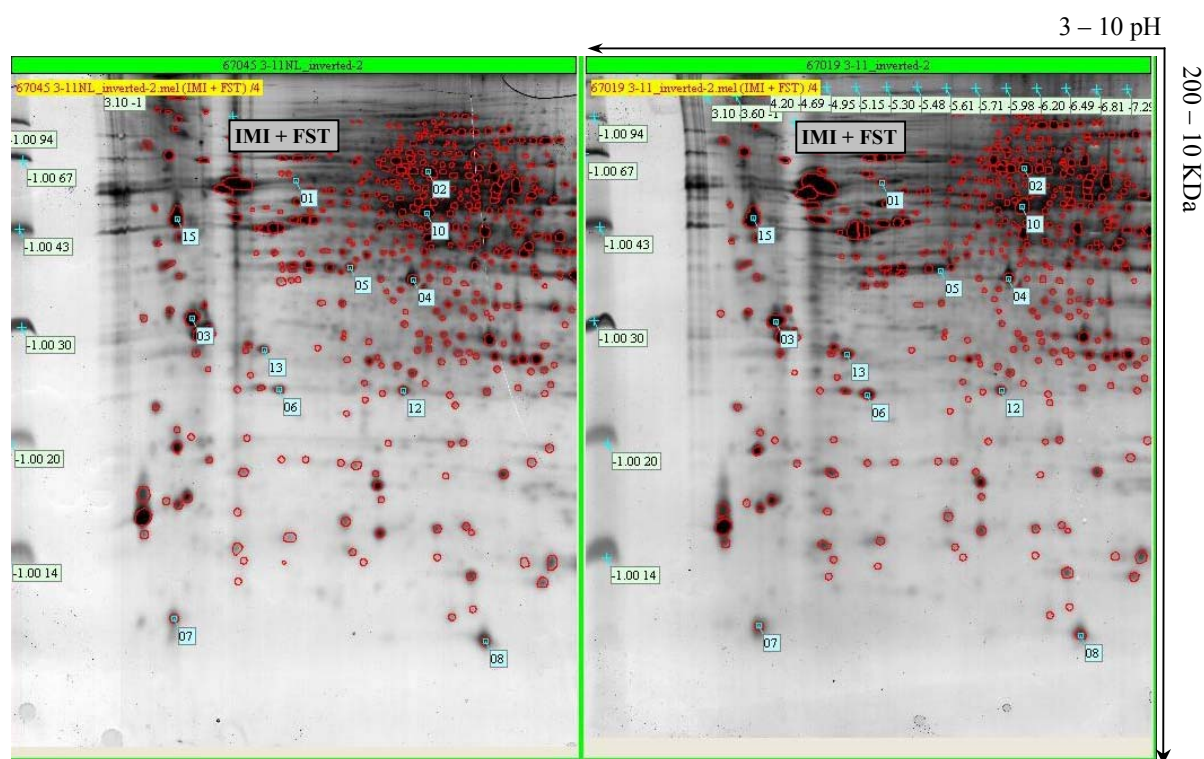


Figura 20. Duplicata de gel 2DE corado com Coomassie para amostras de proteínas de hipocampo de ratos submetidos ao tratamento crônico com imipramina e avaliados no modelo comportamental do nado forçado. *Spots* de proteínas estão circulado em vermelho. Na horizontal está indicada a focalização isoelétrica e na vertical a migração por peso molecular. Os números de 1 a 15 marcam os *spots* de referência nas duplicatas.

A análise dos géis pelo programa *Image Master* possibilitou identificar 340 *spots* de proteínas de hipocampo dos animais tratados com veículo e 296 *spots* para aqueles tratados com 7NI, ambos não submetidos ao modelo do nado forçado. Um total de 616 *spots* foi identificado para os animais submetidos ao tratamento com veículo, 446 *spots* para aqueles tratados com 7NI e 496 para os tratados com imipramina, sendo todos submetidos ao modelo do nado forçado ao final do tratamento. Por esta análise inicial verifica-se que o estresse do nado forçado aparentemente induziu a expressão protéica, se compararmos a quantidade total de *spots* no gel

para os animais VEH + FST em relação aos demais grupos, sendo que o tratamento farmacológico teria tendência de reverter esse efeito,

Interessados em identificar proteínas que tiveram sua expressão modulada pelo efeito do estresse do nado forçado, os géis dos animais do grupo VEH + NAI foram comparados com os géis dos animais do grupo VEH + FST, Por esta análise, foram identificados 32 *spots* de proteínas com expressão reduzida e 33 *spots* de proteínas aumentadas, no grupo VEH + NAI, em relação ao grupo VEH + FST. Deste total, foram identificada pelo método de MaldTofe 29 proteínas (Tabela 16).

Tabela 15: Proteínas diferentemente expressas entre os grupos VEH + FST e VEH + NAI.

GI	Descrição	%	MS	FC
49481	beta tubulin	11	272	-5,14
54855	triosephosphate isomerase	8	118	2,79
111707	glutathione transferase (EC 2,5,1,18) I	10	49	-∞
123647	Heat shock cognate 71 kDa protein	6	132	-10,16
203055	ATP synthase alpha subunit precursor (EC 3,6,1,3)	13	396	-∞
203658	Cu-Zn superoxide dismutase (EC 1,15,1,1)	32	362	2,22
1170100	Glutathione S-transferase P; AltName: Full=GST class-pi	20	176	3,37
1373363	platelet-activating factor acetylhydrolase isoform Ib beta subunit	15	169	-∞
1374715	ATP synthase beta subunit	18	253	-10,57
1915913	Ulip2 protein	4	63	8,27
6981112	isovaleryl Coenzyme A dehydrogenase	4	80	2,94
8918488	adenylate kinase isozyme 1	30	335	4,48
12853094	unnamed protein product	7	165	-∞
13385854	peptidylprolyl isomerase D	10	187	5,68
40538860	aconitase 2, mitochondrial	8	339	2,58
54400730	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	6	270	-3,21
62653546	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8	161	-∞
157819953	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	9	220	-22,9
1184663	vacuolar adenosine triphosphatase subunit E	10	110	-∞
123230374	dynamin 1	8	390	2,28
13489067	N-ethylmaleimide-sensitive factor	4	202	-4,58
16758446	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD ⁺) alpha	12	236	-∞
260033	Macrophage migration inhibitory factor 13kda protein	42	70	-∞
487851	Dynamin	9	492	-4,28
54855	triosephosphate isomerase	5	72	2,79
57657	pyruvate dehydrogenase E1 alpha form 1 subunit	10	201	4,29
62653546	similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8	162	11,4
6754816	septin 2	3	71	-2,83

GI = identificador do gene no NCBI, % = porcentagem de cobertura; FC = taxa de alteração no grupo VEH + NAI em relação a VEH + FST.

MS = Mascot score. Índice de confiança para identificação protéica. Significativo quando superior a 36. -∞ indica proteínas que estavam presente somente no grupo VEH + FST; +∞ indica proteínas que estavam presentes somente no grupo NAI + FST.

Com o objetivo de identificar o efeito do tratamento farmacológico com 7NI ou imipramina sobre o estresse do nado forçado, foram comparados os géis dos animais do grupo VEH + FST em relação aos géis para os animais dos grupos 7NI + FST ou IMI + FST. A análise dos géis para o grupo tratado com 7NI + FST, possibilitou identificar 10 *spots* de proteínas que tiveram a expressão aumentada, e 97 *spots* de proteínas reduzidos em pelo menos 2 vezes em relação ao grupo VEH + FST. Desta total, foram identificados 26 proteínas pela espectrometria de massa com *score* de identidade superior a 36 (Tabela 17).

Tabela 16: Proteínas diferentemente expressas entre os grupos VEH + FST e 7NI + FST.

GI	Descrição	%	MS	FC
1051270	14-3-3 zeta isoform	9	178	4,94
10567816	guanine nucleotide binding protein, alpha activating polypeptide	13	335	2,45
109501183	similar to ribosomal protein L15	6	36	-∞
13489067	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein	2	77	-2,41
1363309	phosphopyruvate hydratase (EC 4,2,1,11) - rat	7	137	-∞
16758446	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	8	233	-2,13
202837	aldolase A	12	194	-∞
203033	F1-ATPase beta subunit	12	167	-∞
206671	type II cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit	7	81	-∞
223556	tubulin alpha	17	394	136,78
241081	synuclein SYN2 [Rattus sp.]	10	153	-∞
26023949	enolase 2, gamma	13	266	-∞
306890	Chaperonin (HSP60)	2	103	6,6
42476181	malate dehydrogenase, mitochondrial		159	+∞
51948476	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	5	152	4,65
538426	triosephosphate isomerase	11	216	+∞
56200	unnamed protein product	2	81	-2,58
57029	H(+)-transporting ATP synthase	5	96	1,04
57429	unnamed protein product	4	106	-∞
62664759	similar to prohibitin	14	158	2,99
	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase			
6756041	activation protein, zeta polypeptide	9	178	-∞
68163565	secernin 1	7	108	-∞
7106439	tubulin, beta 5	6	154	7,29
71620	actin beta - rat	11	247	5,12
769822	glial fibrillary acidic protein	6	77	4,73
8393910	phosphatidylethanolamine binding protein	14	212	2,29
8394009	peptidylprolyl isomerase A	16	115	-∞
984553	G protein beta 1 subunit	7	90	-∞

GI = identificador do gene no NCBI, % = porcentagem de cobertura; FC = taxa de alteração no grupo 7NI + FST em relação a VEH + FST.

MS = Mascot score. Índice de confiança para identificação protéica. Significativo quando superior a 36. -∞ indica proteínas que estavam presente somente no grupo VEH + FST; +∞ indica proteínas que estavam presentes somente no grupo 7NI + FST.

A comparação dos géis para o grupo tratado com imipramina possibilitou identificar 43 *spots* de proteínas com expressão aumentada, e 48 *spots* de proteínas reduzidos, também em pelo menos 2 vezes, quando comparado ao grupo tratado com VEH + FST. Deste total, 54 foram identificados pela espectrometria de massa com *score* de identidade superior a 36 (Tabela 18).

Tabela 17: Proteínas diferentemente expressas entre os grupos VEH + FST e VEH + IMI.

GI	Descrição	%	MS	FC
56200	unnamed protein product	7%	159	-2,33
56643	unnamed protein product	7%	145	-∞
203055	ATP synthase alpha subunit precursor (EC 3,6,1,3)	21%	621	-∞
204503	glutathione S-transferase Yb-1 subunit (EC 2,5,1,18)	22%	231	-∞
204570	major beta-hemoglobin	0,14	174	4,33
347019	dnaK-type molecular chaperone hsp72-ps1 - rat	0,05	85	-∞
	mitochondrial long-chain enoyl-CoA hydratase/3-hydroxycyl-CoA dehydrogenase			
510108	alpha-subunit	3%	126	-2,87
538426	triosephosphate isomerase	0,28	323	7,19
1220484	elongation factor-1 alpha	4%	96	-∞
4105605	voltage dependent anion channel	13%	139	-∞
6671672	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2		151	-1,82
11693172	calreticulin	8%	238	12,31
12835802	unnamed protein product	2%	61	-3,37
16758270	F-box protein 2	22%	263	-∞
18093102	dynamin 1	2%	60	-3,51
30027750	alpha-globin [Rattus sp.]	44%	160	-∞
40538860	aconitase 2, mitochondrial	10%	349	-∞
57977323	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	13%	236	-∞
77404242	synapsin II isoform 1	6%	109	-∞
109487304	similar to actin related protein 2/3 complex subunit 2	0,09	131	6,8
109492380	similar to Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	11%	207	-∞
149034624	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3B	0,06	31	-26,39
149064065	rCG23367	2%	24	-∞
157819953	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	9%	200	1,85
119959830	beta-actin	0,16	184	-12,42
13162287	D-dopachrome tautomerase	2%	107	-3,38
14043072	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1	0,02	42	4,18
149017236	rCG49429	18%	115	-∞
16757994	pyruvate kinase, muscle	3%	101	3,81
16758892	calbindin 2	4%	37	-∞
18093102	dynamin 1	0,04	142	-4,81
187937028	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9	2%	158	-∞
1944322	unc-18 homologue	6%	164	2,24
200038	neurofilament-L	6%	99	+∞
202837	aldolase A	8%	141	-∞
206113	phosphoglycerate kinase	7%	85	-∞
206205	M2 pyruvate kinase	5%	112	-∞
220838	dihydrolipoamide acetyltransferase	0,05	115	-2,91
25453420	glutathione S-transferase, pi	20%	167	-∞
26023949	enolase 2, gamma, neuronal	11%	105	-∞
3121992	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial ALDH1	6%	80	-5,27
31982030	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	5%	55	-∞
41350312	nascent polypeptide-associated complex alpha subunit isoform b	25%	204	-∞
4507297	syntaxin binding protein 1 isoform a [Homo sapiens]	0,03	45	2,69
49518	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein [Cricetulus longicaudatus]	2%	46	-3,89
55741424	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1, 51kDa		235	-∞
55825	unnamed protein product	41%	217	-∞
56200	unnamed protein product	0,1	203	2,8
56643	unnamed protein product	19%	358	-4,92
57977323	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	7%	133	-∞
6753324	chaperonin containing Tcp1, subunit 6a	2%	44	-3,65
	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta			
6756039	polypeptide	7%	102	-∞
6980972	glutamate oxaloacetate transaminase 2	12%	233	-∞
6981146	L-lactate dehydrogenase B	6%	107	-∞

GI = identificador do gene no NCBI, % = porcentagem de cobertura; FC = taxa de alteração no grupo VEH + NAI em relação a VEH + FST.

MS = Mascot score. Índice de confiança para identificação protéica. Significativo quando superior a 36. -∞ indica proteínas que estavam presente somente no grupo VEH + FST; +∞ indica proteínas que estavam presentes somente no grupo IMI + FST.

A comparação dos grupos 7NI + NAI e VEH + NAI mostrou que somente 12 proteínas estariam mais expressas e 15 proteínas estariam menos expressas no grupo 7NI + NAI em relação ao grupo VEH + NAI. Desta forma, em virtude do baixo número de proteínas diferentemente expressas entre os grupos 7NI + NAI e VEH + NAI, tendência que também foi observada entre as bibliotecas SAGE na análise de agrupamento hierárquico, optou-se por não sequenciar as proteínas dos géis para os grupos 7NI + NAI e VEH + NAI por razões técnicas.

A análise de enriquecimento pelo método do MetaCore para as proteínas sequenciadas diferentemente expressas entre os grupos VEH + NAI e VEH + FST apontou que entre as vias principalmente enriquecidas para as proteínas identificadas diferentemente expressas estão a fosforilação oxidativa ($P=4,59^{-3}$), estresse oxidativo ($P=3,72^{-2}$) e prevenção da apoptose induzida por ROS ($P=3,97^{-2}$). Estes resultados parecem estar em congruências para aqueles encontrados na comparação dos genes diferentemente expressos para as bibliotecas SAGE destes mesmos grupos e sugerem que o estresse oxidativo e/ou metabólico seja evento relevante na instauração das consequências comportamentais do estresse.

Houve, por sua vez, enriquecimento para as funções gênicas relacionadas à apoptose e/ou proliferação associada à proteína BAD ($P=2,79^{-3}$), via de transcrição governada por CREB ($P=2,93^{-3}$) e regulação de citoesqueleto e rearranjo de citoesqueleto ($P=9,19^{-4}$) indicada pela análise utilizando o método de MetaCore, para as proteínas diferentemente expressas entre os grupos VEH + FST e 7NI + FST.

A análise de enriquecimento para as proteínas identificadas pelo método *MaldToef* entre os grupos VEH + FST e IMI + FST acusou que entre os principais processos fisiológicos e vias metabólicas enriquecidas estão processos fisiológicos sinalizados por receptor GABA-A ($P=2,75^{-5}$); ciclo do ácido tricarboxil mitocondrial (TCA) ($P=5,78^{-3}$), resposta a hipóxia e estresse

oxidativo ($P=3,28^{-4}$); processos ligados a citoesqueleto de actina ($P=2,19^{-2}$) e processos catalíticos de peróxido de hidrogênio ($P=2,87^{-7}$).

4.4. Efeito do N-acetil-L-cisteína em animasi submetidos ao teste do nado forçado

Foi observado efeito significativo no tempo de imobilidade durante o FST ($F_{(6,35)} = 6,86$; $P<0,001$). A análise *post-hoc* de Duncan ($P<0,05$) indicou de que o tempo de imobilidade para os ratos tratados com NAC nas doses de 15, 50 ou 150 mg/Kg foram significativamente reduzidos quando comparado ao veículo (Figura 20), Contudo, a análise de variância não detectou efeito significativo na atividade locomotora geral medida no campo aberto (distância percorrida, $F_{(6,39)}=1,80$, NS; Figura 21).

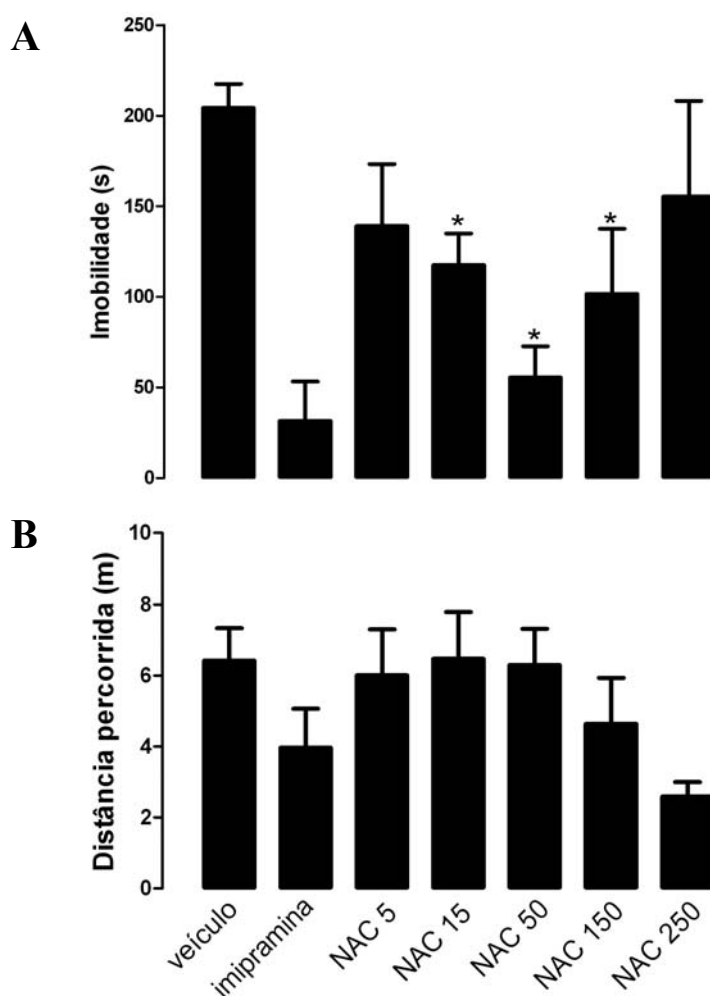


Figura 21. Efeito do tratamento intraperitoneal com veículo (salina, 2 ml/Kg), imipramina (15 mg/Kg) ou N-acetil-L-cisteína (NAC 5, 15, 50, 150 e 250 mg/Kg) no tempo de imobilidade no teste do nado forçado (N = 4-8/grupo) e distância percorrida pelo teste do campo aberto (N = 5-8/grupo) em ratos. Os animais receberam as injeções imediatamente após o pré-teste, 5 h depois, e 1 h antes da sessão teste, no teste do nado forçado, e 1 h antes no teste a arena. As barras representam média + SEM. * $P < 0,05$ comparado ao veículo pelo teste de Duncan.

5. DISCUSSÃO

Por volta da década de 70 estudos de prevalência de doenças neuropsiquiátricas entre gêmeos idênticos produziram fortes evidências do substrato genético nestas afecções ((BERTELSEN; HARVALD; HAUGE, 1977). Desde então tem ganhando corpo os grupos interessados na investigação da associação entre polimorfismos de DNA (descritos com polimorfismos de único nucleotídeo - SNPs), expressão gênica, genômica (DRIGUES et al., 2003; POZNIAK; PLEASURE, 2006; JOCA; FERREIRA; GUIMARAES, 2007; SEQUEIRA et al., 2007) ou proteômica (KHAWAJA et al., 2004; MU et al., 2007) com fatores ambientais e endógenos que possam interferir na suscetibilidade às doenças neuropsiquiátricas ou na resposta terapêutica a psicotrópicos.

A hipótese da interação genética e ambiente recebeu substancial reforço após uma série de trabalhos que demonstraram a associação entre o polimorfismo no promotor para proteína transportadora de serotonina (5-HTTLPR) e a suscetibilidade para manifestação de sintomas psiquiátricos como ansiedade e depressão, uma vez que essa associação parece estar presente somente entre indivíduos com prévio histórico de experiências estressantes (KENDLER; KARKOWSKI; PRESCOTT, 1999; CASPI et al., 2003; KENDLER et al., 2005; ZALSMAN et al., 2006; CANLI; LESCH, 2007). Contudo, apesar destas importantes contribuições, o polimorfismo em único gene parece não ser suficiente para explicar questões como a latência para o efeito do tratamento com antidepressivos, a resistência ao tratamento, recaídas após interrupção do tratamento, o papel das neurotrofinas e a neurogênese ou ainda o aparente paradoxo entre o alelo curto “S” no promotor 5-HTTLPR que condiciona uma menor expressão da proteína recaptadora de serotonina (5-HTT) e os efeitos dos inibidores da recaptação de

serotonina (SSRIs), no qual o primeiro induziria fenótipo “pró-depressivo” enquanto as drogas causariam este efeito antidepressivo. Neste contexto, acredita-se que a representação genômica em larga escala poderá gerar novos dados para a interpretação da neurobiologia de doenças complexas com a ansiedade e depressão (CANLI; LESCH, 2007; INSEL; LEHNER, 2007). Dentro dessa perspectiva o presente estudo procurou identificar genes e/ou proteínas que possam estar relacionados ao distúrbio afetivo do tipo depressivo e aos mecanismos moleculares pelos os quais a neurosinalização nitrérgica e/ou serotoninérgica/noradrenérgica no hipocampo atuaria para promover reversão das consequências comportamentais do estresse.

O presente estudo confirmou o efeito antidepressivo observado pelo tratamento crônico com um inibidor preferencial da sintase de óxido nítrico neuronal, o 7NI, de forma semelhante ao observado quando os animais foram tratados com imipramina, um reconhecido antidepressivo tradicionalmente descrito como inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina (AXELROD; WHITBY; HERTTING, 1961; CARLSSON; LINDQVIST, 1963; RAISMAN; BRILEY; LANGER, 1979). Apesar destas drogas aparentemente desenvolverem seus efeitos por mecanismos distintos, ambas promovem a proliferação celular e neuroplasticidade, resultando, em última análise, no aumento na atividade hipocampal, mais especificamente na região CA1, evento que pode ser decisivos para a obtenção dos efeitos antidepressivos (SANTARELLI, SAXE, GROSS et al., 2003; AIRAN, MELTZER, ROY et al., 2007; ZHOU et al., 2007). Para ambas as drogas existem evidências experimentais mostrando que seus efeitos podem estar associados ao aumento da expressão de fatores de crescimento como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (SAMIA et al., dados não publicados)

(SHIRAYAMA, CHEN, NAKAGAWA et al., 2002; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006; CASTREN; VOIKAR; RANTAMAKI, 2007).

A análise inicial das bibliotecas SAGE geradas para as amostras de hipocampo mostram a complexidade do transcriptoma desta estrutura, o que reflete sua complexidade celular e funcional, se comparada a bibliotecas SAGE para outros tecidos. Datson e colaboradores (DATSON et al., 2001a) chegaram a essa mesma conclusão ao realizarem o primeiro inventário do padrão de expressão gênica em hipocampo de ratos, Assim como no presente estudo, foram identificados cerca de 25,000 a 30,000 genes a partir do seqüenciamento de cerca de 60,000 à 80,000 *tags*. Além disso, se considerada a biblioteca para os animais submetidos ao tratamento com veículo e não submetidos ao estresse do nado forçado, foram encontrados genes com maior expressão relacionados à cadeia oxidativa mitocondrial, componentes sinápticos, canais iônicos, quinases e fosfatases, assim como observando no estudo de Datson e colaboradores. Estes dados sugerem a reprodutibilidade da estratégia SAGE, mesmo considerando divergências menores no nível de expressão ou na identificação de genes por *tags* seqüenciadas que, ao menos em parte, podem estar relacionadas às diferenças de protocolo experimental ou ainda as atualizações no banco de seqüências do NCBI, desde a publicação daquele estudo.

A análise do padrão global da expressão gênica entre os diferentes grupos experimentais deixou evidente que o estresse comportamental do nado forçado tem efeito modulatório sobre a expressão de cerca de 4% a 5% do total de transcritos, sendo que mais de 85% destes genes tiveram sua expressão induzida independentemente do efeito do tratamento farmacológico. A análise de agrupamento hierárquico (*clusterização*), o qual classificou os animais em dois grupos diferentes, estressados e não estressados, contribuiu para essa interpretação. Além disso, estes efeitos estão refletidos na análise dos géis bidimensionais para as amostras protéicas, uma vez

que foi verificado um número cerca de 30% maior de *spots* de proteínas para os géis dos animais submetidos ao estresse do nado forçado, com tratamento prévio com veículo em relação aos demais grupos. Este resultado aponta para um efeito predominante do estresse sobre o padrão de expressão gênica no hipocampo dos animais submetidos ao modelo do nado forçado,

A modificação da transcrição gênica, ou *ações genômicas* dos corticosteróides, provavelmente é o principal mecanismo pelo qual os glicocorticóides exercem suas ações no SNC. Em particular os receptores de glicocorticóides (GR) por serem principalmente recrutados quando o nível de corticosteróides está elevado, como na situação de estresse, e por facilitarem o *feedback* negativo no eixo HPA. Por sua vez, os receptores de mineralocorticóides (HERKEN, GUREL, SELEK et al.) possuem afinidade até 10 vezes maior pela corticosterona e estão preferencialmente distribuído nas estruturas límbicas, Diferentemente dos GR, respondem aos níveis basais de corticosteróides e atuam mantendo a atividade basal do eixo HPA. No entanto, ambos os receptores pertencem a uma família de fatores de transcrição e respondem pela modificação da expressão de genes alvos ao se deslocarem para o núcleo, onde podem tanto inibir a transcrição por *transrepressão* ou induzir por *transativação* (DE KLOET; JOELS; HOLSBOER, 2005; DATSON et al., 2008). Estudo prévio utilizando fatias de hipocampus submetidas a altas doses de corticosterona mostrou que o padrão da expressão dos genes hipocampais em resposta a ativação de GR obedece a uma “onda” na qual ocorre predominantemente redução na primeira hora, aumento na terceira hora, com retorno aos níveis basais a partir da quinta hora (MORSINK et al., 2006). Desta forma, é provável que no presente estudo se esteja “visualizando” a janela temporal na qual os genes se encontram, na sua maioria, na fase ascendente da modulação da expressão. Esse efeito pode estar refletido na indução da maioria dos genes observada nos animais submetidos ao estresse do FST, como discutido acima.

Interessados em identificar genes responsivos a GR (GRES). Datson e colaboradores analisaram bibliotecas SAGE para hipocampo de ratos após administração aguda de corticóides em altas doses. Dentre os genes identificados, o tratamento agudo com corticosterona aumentou significativamente a expressão do gene para subunidade do Citocromo c oxidase, gene mitocondrial para citocromo b e ATP sintase subunidade 6 (L), sendo que o contrário também foi válido para os genes da ATP sintase subunidade F0 subunidade 6, Cox VIa e sequência expressa (ESTs, Rn,13675) (DATSON et al., 2001b). Neste estudo, os autores argumentam para o evidente papel dos glicocorticóides (ou estresse) na modulação de genes ligados a cascata oxidativa mitocondrial. Alinhado a estas conclusões, a análise de enriquecimento funcional, tanto para as bibliotecas SAGE como para as bibliotecas proteômicas, acusou que os processos fisiológicos ligados a fosforilação oxidativa, estresse oxidativo e prevenção a apoptose induzida por ROS estão entre os principais processos fisiológicos modulados pelo estresse comportamental. Um estudo de *microarray* entre indivíduos sem histórico de doenças psiquiátricas, suicidas sem histórico de depressão e suicidas com depressão também identificou significativa alteração de genes relacionada ao controle do metabolismo, dentre eles a ATPase V1 subunidade C (ATP6V1C1) e ATPase Na⁺/K⁺ Kp transportador, b-2 polipeptídeo (ATP1B2)(SEQUEIRA, KLEMPAN, CANETTI et al., 2007). Outros dois estudos de *microarray* para amostras de hipocampo e córtex pré-frontal de ratos submetidos ao modelo de depressão pelo desamparo aprendido, detectaram alterações na expressão de genes ligados a síntese de ATP (Atp1a1, Atp1b1 e Aclt) (KOHEN et al., 2005) e NADH citocromo 5-b, precursor mitocondrial de NADH desidrogenase, citocromo 5b solúvel, dentre outros (NAKATANI et al., 2004). Além destes trabalhos, uma série de outros estudos em farmacogenômica também identificou alteração de genes mitocondriais e proteínas que incluem o complexo citocromo c, família de peroxiredoxina

e a proibitina (proteína que aumenta a função mitocondrial) (KHAWAJA, XU, LIANG et al., 2004; WONG et al., 2004; CONTI et al., 2007; MARAIS et al., 2009; MCHUGH et al., 2009). Curiosamente, um estudo já havia mostrado que a administração de NADH, e não NAD, teve efeito tipo-antidepressivo pelo modelo do nado forçado (REX; SCHICKERT; FINK, 2004). Assim, o presente trabalho e os estudos citados sugerem que prejuízos no funcionamento da cascata de fosforilação oxidativa estariam envolvidos na neurobiologia da depressão, apesar de ainda não esclarecer os mecanismos pelos quais se procede.

Para testar esta hipótese realizamos o experimento testando a N-acetil-L-cisteína (GOSHEN, KREISEL, BEN-MENACHEM-ZIDON et al.) um potente sequestrador de radicais livres, em animais submetidos ao modelo do nado forçado, Nossos resultados forma compatíveis com a hipótese original, já que a droga diminuiu a imobilidade dos animais durante o teste, indicando um efeito tipo-antidepressivo. Corroborando estes resultados, ensaio clínico recente confirmou o efeito antidepressivo do NAC (BERK et al., 2008a). O mecanismo de atuação desta droga ainda é discutível, mas o NAC é substrato para formação da cisteína, que participa na formação do GSH, o principal sequestrador de reativos de oxigênio (ROS) endógeno, sugerindo que o incremento dos mecanismos antioxidantes pode ser um emergente alvo na terapia dos distúrbios psiquiátricos (BERK, COPOLOV, DEAN et al., 2008a; BERK, NG, DEAN et al., 2008b).

A capacidade da fosforilação oxidativa mitocondrial de gerar espécies reativas de oxigênio e suas conseqüências para doenças neurodegenerativas e psiquiátricas como Parkinson, Alzheimer e esquizofrenia é relativamente bem conhecida (LENAZ, 2001; SU et al., 2009; WANG et al., 2009). No entanto, o seu papel como fonte de ROS nos distúrbios afetivos ainda está por ser melhor investigado. A inibição dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial I-

III e II-III foi descrita em cérebro de animais submetidos ao estresse de restrição. Este efeito foi acompanhado do aumento da produção de NO e piora dos indicadores de estresse oxidativo como o consumo de GSH e aumento da peroxidação lipídica (MADRIGAL et al., 2001). A inibição do complexo II e III também foi observada em áreas do cérebro como córtex e hipocampo de animais submetidos ao estresse crônico variado (REZIN et al., 2008), sendo que o tratamento com fluoxetina (GAMARO et al., 2003) e eletroconvulsoterapia experimental revertem parte destes efeitos (BURIGO et al., 2006). Além disso, extenso corpo de estudos tem mostrado que o NO e seus derivados (S-nitrosotiol e peroxinitrito) exercem potente efeito inibitório na cadeia de transportadora de elétrons em diferentes pontos, com consequência para a utilização celular de O₂ e formação de ROS pela mitocôndria. Este efeito pode ocorrer até mesmo em baixas concentrações de NO, sendo transitório ou irreversível (CLEETER et al., 1994; LIZASOAIN et al., 1996). O efeito inibitório do NO sobre a cascata oxidativa pode ser ainda maior pelo sinergismo como o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), o principal metabólico da dopamina produzido pela atividade da monoamina oxidase e aldeído desidrogenase, ambas localizados ao nível mitocondrial (KOPIN, 1985; NUNES; ALMEIDA; LARANJINHA, 2005).

Os resultados do presente estudo, portanto, são compatíveis com a hipótese que relaciona a exposição a estressores intensos ao desenvolvimento de distúrbio depressivo via os seguintes mecanismos: 1) aumento da produção de NO mediante ativação de receptores NMDA (GARTHWAITE et al., 1989); 2) aumento na liberação dos glicocorticóides, que por sua vez, aumentariam a demanda energética neuronal (GAMARO, STRECK, MATTE et al., 2003); 3) a combinação dos efeitos de aumento da demanda energética com a inibição da cadeia respiratória mediados pela excessiva produção de NO (CLEETER, COOPER, DARLEY-USMAR et al., 1994; LIZASOAIN, MORO, KNOWLES et al., 1996) e metabólitos catecolaminérgicos

favoreceria o desbalanço entre fatores pró- e anti-oxidantes, favorecendo os primeiros e aumentando no estresse oxidativo (NUNES; ALMEIDA; LARANJINHA, 2005). Esse também atuaria na própria cadeia respiratória prejudicando a formação do NADH em um mecanismo de retro-alimentação (JOU; CHIU; LIU, 2009). Os resultados finais destes processos seriam prejuízos na funcionalidade de neurônios hipocampais (RIVAS-ARANCIBIA et al., 2009), com remodelagem dendrítica, aumento de apoptose, e comprometimento da neurogênese hipocampal (LIZASOAIN, MORO, KNOWLES et al., 1996), bem como alteração nos processos relacionados à neuroplasticidade, por inibir a formação de LTP e formação da LTD (KAMSLER; SEGAL, 2003; MAALOUF; RHO, 2008).

Além dos correlatos neurofisiológicos, estudos clínicos e pré-clínicos corroboram esta idéia, ao mostrarem que o distúrbio tipo depressivo é acompanhado de incremento nos danos oxidativos em diferentes áreas cerebrais e que drogas antidepressivas revertem parte destes efeitos (BILICI, EFE, KORUGLU et al., 2001; PAUL; SKOLNICK, 2003; EREN; NAZIROGLU; DEMIRDAS, 2007; HERKEN, GUREL, SELEK et al., 2007; BERK, COPOLOV, DEAN et al., 2008a; FERREIRA et al., 2008). A redução da atividade hipocampal também está refletida nos estudos de neuroimagens por retratarem redução funcional do hipocampo e córtex dorsolateral entre indivíduos com sintomas depressivos, além de mostrarem que o tratamento antidepressivo eleva o nível de atividade metabólica nestas estruturas (CAMPBELL; MACQUEEN, 2004; DREVETS; PRICE; FUREY, 2008; KOENIGS; GRAFMAN, 2009). No conjunto estas evidências sugerem que distúrbios metabólicos e funcionais promovidos pelos danos oxidativos poderiam estar promovendo as alterações neuronais/neuroanatômicas/neurofuncionais observadas na depressão.

No entanto, mesmo que o estresse oxidativo participe no distúrbio tipo depressivo, dificilmente ele conseguiria explicar todas as alterações observadas na depressão. Nesse sentido, processos ligados à reorganização sináptica, neurogênese e ainda a sinalizadores do sistema imune também parecem estar envolvidas na fisiopatologia deste transtorno. A identificação no presente estudo pelas análises SAGE de que processos celulares relacionados à apoptose e/ou proliferação mediados por NF- κ B/BAX-citocromo C via sinalização de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, remodelagem de citoesqueleto e formação de neurofilamentos, também estão significativamente alterados na comparação entre animais não estressados e estressados, argumenta a favor da participação de fatores adicionais ao estresse oxidativo na neurobiologia da depressão,

O fator nuclear κ B é um fator de transcrição que compreende uma família composta por 5 membros (também conhecido com família Rel), que são o p50 (produto do gene NF- κ B1), p52 (produto do gene NF- κ B2), p65 (também conhecido como RelA), cRel e RelB. Os membros da família Rel funcionam como dímeros, sendo que os cinco membros podem homodimerizar ou heterodimerizar. Todos os membros da família compartilham os domínios homólogos Rel, os quais possuem a região crucial para ligação ao DNA, sítio de dimerização, localização nuclear, e interação com o fator inibidor I κ B (MEFFERT; BALTIMORE, 2005). Tem sido demonstrado que no SNC o NF- κ B pode ser ativado, dentre outros fatores, pelo glutamato, VEGF, 5-HT, BDNF e H₂O₂ (KALTSCHMIDT; WIDERA; KALTSCHMIDT, 2005). Dentre os genes induzidos pela ativação do NF- κ B estão moléculas de adesão de células neuroniais, BDNF, ciclooxygenase II induzida e quinase Ca²⁺/calmodulina dependente II (CamKII) (PICCIOLI et al., 2001; NICKOLS et al., 2003; KALTSCHMIDT; WIDERA; KALTSCHMIDT, 2005; MEFFERT; BALTIMORE, 2005; SARNICO et al., 2009). Experimentalmente, foi visto que

danos no DNA por irradiação ionizante ativa cascata sinalizadora por meio da ativação da quinase I κ B inibitória (IKK), que por fosforilar o I κ B, o direciona para degradação, promovendo a ativação do NF- κ B. Este transloca-se para o núcleo ativando a transcrição de genes antiapoptóticos (WANG et al., 1998; GHOSH; KARIN, 2002). No entanto, esta atividade parece ser dependente de Poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PAP-1), um importante mediador dos processos antiapoptóticos acionados mediante danos de DNA (VEUGER; HUNTER; DURKACZ, 2009). Por sua vez, a enzima serina/treonina 2A fosfatase (PP2A) parece participar neste sistema por controlar a ativação da proteína quinase IKK (KRAY et al., 2005).

Por outro lado, o fator de transcrição STAT-3 também pertence a uma família de fatores de transcrição de resposta rápida. Embora ele possa assumir função pro- ou antiapoptótica a depender dos co-ativadores, tem sido verificado que o STAT-3 usualmente atua como anti-apoptótico frente a diferentes estímulos estressores (BOYD et al., 2003; GUO et al., 2008; LI et al., 2009).

Por sua vez, a via das proteínas ativadas por mitose (MAPK) consiste de três módulos paralelos de proteínas quinase, que são as proteínas quinase reguladas por sinalização extracelular (ERK1/2), a Jun-N-terminal quinase (JNK), e via MAPK p38, as quais governam a proliferação celular, diferenciação, resposta a estresse, entre outras funções (CHANG et al., 2003; SHIODA; HAN; FUKUNAGA, 2009). Em geral, a ativação da via MAPK p38 está associado à morte celular enquanto a via ERK relaciona-se com citoproteção. Com base neste mecanismo, é provável que o aumento da expressão dos genes MAK1-3, observado nos animais estressados em relação aos não estressados, esteja contribuindo na sinalização em favor do balanço anti-apoptose (YU et al., 2004).

Por fim, a inibição da expressão da proteína do citocromo C (Cycs) contribui com a proposta de ativação de fatores anti-apoptóticos ligados à relação Bcl/BAX, uma vez que esta proteína tem como função a sinalização apoptótica ao ser liberada pela mitocôndria mediante o desbalanço entre a relação das proteínas antiapoptótica Bcl e pró-apoptótica BAX, resultando na ativação da caspase 3 (CHUNG et al., 2008). Assim, é possível que o estresse induzido pelo nado forçado tenha produzido um desafio oxidativo (dentre outros sinalizados pelo Cycs e PARP-1), o qual teve como resposta a ativação dos fatores anti-apoptóticos por meio da ativação das vias $G_{(i)}$ -AC-PP2A-IKK-NF- κ B/PARP-1, $G_{(i)}$ -JAK2-STAT-3, ou ainda pela via $G_{(i)}$ -GRB2-ERK1/2, em resposta ao estímulo pró-apoptótico Bcl-2/Bax-Cycs. Curiosamente, estudos realizados com células cardíacas registraram que o desafio por meio do tratamento com adrenalina promove aumento do consumo energético, aumento da produção de ROS, com conseqüente ativação de NF- κ B e conseqüente indução de proteína HSP70, e ativação de mecanismos de proteção celular contra a apoptose, como retenção de Cys mitocondrial e inibição de caspase 3 (COSTA et al., 2009a; COSTA et al., 2009b). Completando esta linha de raciocínio, no presente estudo também foi verificado que a proteína HSP70 apresentou uma indução de sua expressão de 4,56 vezes nos animais estressados em relação ao controle. Assim, até onde é de nosso conhecimento, o presente estudo reúne pela primeira vez evidências da ativação de mecanismos anti-apoptóticos em resposta ao estresse comportamental do nado forçado,

Além da sinalização de proliferação e/ou morte celular por estresse, processos plásticos no hipocampo também ficaram evidenciados. O efeito do estresse e o tratamento com antidepressivos sobre a remodelagem e alterações plásticas na formação hipocampal está relativamente bem documentada, tanto para estudos em humanos como em modelos animais (MAGARINOS; MCEWEN, 1995; MALBERG, EISCH, NESTLER et al., 2000; SOUSA et al.,

2000; DRANOVSKY; HEN, 2006; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006). No entanto, ainda existem aspectos pouco compreendidos ou aparentemente controversos na literatura que deixam dúvidas a respeito dos mecanismos da reestruturação plástica hipocampal (HAJSZAN et al., 2009). De qualquer modo, o presente estudo reafirma o envolvimento de mecanismos neurofisiológicos associados à neuroplasticidade, ao mostrar que grupos gênicos ligados aos processos de remodelagem de citoesqueleto por Rho GTPase e neurofilamentos são modulados em resposta a estressor relacionado à depressão, Rho pertence a uma superfamília de pequenas proteínas ligadoras de GTPase denominada família Ras, descrita em sarcoma de ratos (HARVEY, 1964), a qual também incluem proteínas do tipo Ras e Ran. São conhecidas como proteínas de mudança, isto é, liga-desliga, por rápida mudança conformacional ao se ligarem ao GTP ou GDP (BUSTELO; SAUZEAU; BERENJENO, 2007). Mediante sinalizadores extracelulares a proteína RhoA-GTPase regula a função das proteínas quinases LIM 1 e 2 (LIMK1/2), que por intermédio da confilina estabelece o controle dinâmico da polimerização/despolimerização da actina. O sistema LIM-Confilina também está sob o controle da proteína Cdc42, atuando igualmente no controle dinâmico dos filamentos de actina. No entanto, acredita-se que enquanto a sinalização Rho-GTPase-LIM-Confilina esteja mais ligada à retração dendrítica com sequestro da actina para a formação de lamelipódio e filipódio, a sinalização com Cdc42 parece estar ligada ao prolongamento dos cones de crescimentos e ramificações dendrítica (CHEN et al., 2006). Apesar de ainda haver poucos registros na literatura dos mecanismos pelos quais a sinalização Rho modula a LTP, foi verificado que a inibição da GTPase-Rho-quinase aumenta a amplitude da LTP, reduzindo a plasticidade, isto é, mantendo os contatos e prevenindo a formação de novos contatos sinápticos (O'KANE; STONE; MORRIS, 2004). Interessantemente, foi verificado que o tratamento de neurônios de retina com BDNF

aumenta a atividade da proteína Cdc42, com aumento da formação de filopodium e crescimento (CHEN, GEHLER, SHAW et al., 2006). Recentes estudos têm mostrado que componentes do citoesqueleto ligados às proteínas da subfamília Rho exercem relevante função durante a LTP, de modo que a sinalização via RhoA-ROCL-LIM2 atua no estágio inicial da formação da LTP e a via Rac1-LIMK1 na sua manutenção e consolidação (REX et al., 2009). Este efeito, se extrapolado para os resultados observados no presente estudo, o qual indicaram a indução da expressão dos genes das vias RhoA/Rac/Cdc42 nos animais estressados, faz sentido para a remodelagem de neuroplasticidade mediante estímulo estressor. Desta forma, o presente estudo reúne, pela primeira vez, evidências que implicam processos plásticos sinalizados por Rho-GTPase ao distúrbio tipo depressivo.

Em resumo, no que tange aos efeitos do estresse comportamental sobre o padrão de expressão gênica hipocampal, os resultados observados neste estudo sugerem que os prejuízos comportamentais induzidos pelo estresse, associados ao distúrbio depressivo, poderiam estar relacionados a alterações em processos vinculados ao estresse oxidativo, que se refletiriam em modificações em mecanismos neurogênicos e neuroplásticos no hipocampo.

Os mecanismos antidepressivos que envolvem as monoaminas e o óxido nítrico e que interfeririam na expressão gênica e protéica também foram investigados. Verificamos que o tratamento com ambos os fármacos antidepressivos, o 7NI e a imipramina, reverteu a indução da expressão de grande parte dos genes relacionados ao complexo respiratório I-III, succinato desidrogenase e de síntese de ATP. Isto sugere que a atividade dos antidepressivos poderia estar relacionada à redução dos efeitos do estresse sobre a cadeia respiratória celular, com possível redução dos danos oxidativos. A redução dos danos oxidativos por tratamento com antidepressivos já foi descrito em estudos prévios (BILICI, EFE, KOROGLU et al., 2001;

HERKEN, GUREL, SELEK et al., 2007; SARANDOL, SARANDOL, EKER et al., 2007), apesar de que os fatores que levam a esta redução ainda não estarem bem esclarecidos, Foi verificado que subunidades do complexo NADH são capazes de modificar sua capacidade oxidativa, alterando sua capacidade de responder a desafios com ROS (SEO et al., 2006; PARK; LI; BAI, 2007). Tomando por referências estes estudos, parece viável racionalizar que a reorganização do complexo respiratório possa ocorrer como um mecanismo de aumentar o desempenho do sistema em respostas às injúrias por ROS. Desta forma, os efeitos antidepressivos do 7NI e imipramina poderiam compartilhar destes mecanismos, reduzindo o estresse oxidativo na formação hipocampal.

Outro aspecto comum relacionado aos mecanismos antidepressivos das drogas 7NI e imipramina poderia envolver a sua capacidade de modular os processos de plasticidade e remodelagem sináptica hipocampal. A análise de enriquecimento de funções indicou que o 7NI teve efeito preferencial sobre a expressão de genes ligados à adesão célula e remodelagem de citoesqueleto por FAK, enquanto a imipramina atuou preferencialmente sobre genes ligados à remodelagem de citoesqueleto e processos neurofisiológicos sinalizados por receptor 5-HT1A, que estão envolvidos no controle de LTP e LTD, Este resultado poderia ser esperado se considerarmos os resultados prévios na literatura que mostram relevante papel do NO na formação da LTP (O'DELL et al., 1991; LU; KANDEL; HAWKINS, 1999; MIYAMOTO, 2006) e a propriedade de inibidores da NOS de modular processos de plasticidade envolvendo LTP e LTD (BIRNSTIEL; HAAS, 1991; DOYLE et al., 1996).

No entanto, as vias neuromoleculares pelos quais esta modulação se procede parece ser distinta para os dois antidepressivos, O 7NI aparentemente reduziria as consequências do estresse comportamental via redução da expressão de genes relacionados a repostas ao estresse, como

canais de cálcio, c-Jun, AP-1, ao mesmo tempo em que pode ter favorecido as vias sinalizadoras de cálcio mediadas por cálcio-calmodulina-calmodulina quinase II, em detrimento da via pela calmodulina quinase IV, com reflexos sobre a ativação de proteína CREB1. Por sua vez, a imipramina também pode ter revertido os efeitos do estresse, identificado pela repressão dos genes da via STAT-3/NF- κ B/PARP-1 ou AC/PP2A/Bcl-2-Bax, ao mesmo tempo em que eleva a expressão do gene da calmodulina, a qual pode exercer efeitos neuroplásticos mediado pela ativação de proteína CREB, semelhantes aos observados pelo tratamento com 7NI. Outro fator em comum entre as duas drogas foi a inibição das vias sinalizadas por proteína FAK1.

A observação de que somente a imipramina apresentou potente efeito inibidor sobre os mecanismos de controle da expressão gênica mediados pela acetilação/desacetilação de histonas de cromatina reafirma o envolvimento da ativação de grupos gênicos como mecanismo antidepressivo atribuídos à esta droga. Apesar de estar descrito na literatura que a inibição farmacológica da histona deacetilase tem efeito antidepressivo, ainda não está claro os mecanismos pelos quais é estabelecido o controle dos processos de acetilação/deacetilação. Assim, o presente trabalho contribuiu ao mostrar, pela primeira vez, que a modulação da expressão de genes que participariam no controle deste processo pode estar envolvido na propriedade das drogas antidepressivas.

6. CONCLUSÕES

Os efeitos do tipo antidepressivos observados com as drogas 7-nitroindazole e imipramina podem estar relacionados à modulação do padrão de expressão gênica no complexo hipocampal. Como consequência dessa modulação ocorreria redução dos efeitos do estresse metabólico e oxidativo promovido por estressores comportamentais sobre o hipocampo. Esses efeitos diminuiriam os prejuízos causados por aqueles estressores sobre processos plásticos (por exemplo, formação e inibição de LTP e/ou LTD, formação e prolongamento de ramos dendríticos) mediante a modulação das vias Rho-GTPase, FKA1 e ERK1/2. Coerente com esta proposta verificamos que droga antioxidante causa efeito tipo antidepressivo em modelo animal de depressão (FERREIRA, BIOJONE, JOCA et al., 2008).

Outro mecanismo comum entre as duas drogas seria a potencialização das vias sinalizadas por Calmodulina-CREB. Além disso, o efeito tipo antidepressivo da imipramina poderia envolver a modulação de genes relacionados ao controle da transcrição gênica ligados aos processos de acetilação/deacetilação de histonas.

Em conclusão, os resultados do presente estudo confirmam o efeito tipo antidepressivo induzido pelo tratamento crônico com um inibidor da sintase neuronal de óxido nítrico, bem como sugerem o envolvimento de uma série de genes que participam em processos relacionados à neuroplasticidade, crescimento e diferenciação celular. Além disso, os efeitos antidepressivos da imipramina poderiam estar relacionados à modificação da expressão de alguns grupos gênicos distintos daqueles modificados pelo 7NI. Os resultados também produziram evidências do envolvimento dos danos oxidativos no hipocampo sobre as consequências comportamentais do estresse. No conjunto estes dados podem indicar novos possíveis alvos terapêuticos no tratamento da depressão.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABKEVICH, V., CAMP, N.J., HENSEL, C.H., NEFF, C.D., RUSSELL, D.L., HUGHES, D.C., PLENK, A.M., LOWRY, M.R., RICHARDS, R.L., CARTER, C., FRECH, G.C., STONE, S., ROWE, K., CHAU, C.A., CORTADO, K., HUNT, A., LUCE, K., O'NEIL, G., POARCH, J., POTTER, J., POULSEN, G.H., SAXTON, H., BERNAT-SESTAK, M., THOMPSON, V., GUTIN, A., SKOLNICK, M.H., SHATTUCK, D.; CANNON-ALBRIGHT, L. Predisposition locus for major depression at chromosome 12q22-12q23.2. **Am J Hum Genet.** v. 73, p. 1271-81, 2003.
- AGID, O., KOHN, Y.; LERER, B. Environmental stress and psychiatric illness. **Biomed Pharmacother.** v. 54, p. 135-41, 2000.
- AIHARA, M., IDA, I., YUUKI, N., OSHIMA, A., KUMANO, H., TAKAHASHI, K., FUKUDA, M., ORIUCHI, N., ENDO, K., MATSUDA, H.; MIKUNI, M. HPA axis dysfunction in unmedicated major depressive disorder and its normalization by pharmacotherapy correlates with alteration of neural activity in prefrontal cortex and limbic/paralimbic regions. **Psychiatry Res.** v. 155, p. 245-56, 2007.
- AIRAN, R.D., MELTZER, L.A., ROY, M., GONG, Y., CHEN, H.; DEISSEROTH, K. High-speed imaging reveals neurophysiological links to behavior in an animal model of depression. **Science.** v. 317, p. 819-23, 2007.
- AKHONDZADEH, S., JAFARI, S., RAISI, F., NASEHI, A.A., GHOREISHI, A., SALEHI, B., MOHEBBI-RASA, S., RAZNAHAN, M.; KAMALIPOUR, A. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. **Depress Anxiety.** v. 26, p. 607-11, 2009.
- AKISKAL, H.S.; MCKINNEY, W.T., JR. Depressive disorders: toward a unified hypothesis. **Science.** v. 182, p. 20-9, 1973.
- ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol.** v. 124, p. 319-35, 1965.
- ALTSCHULE, M.D., SIEGEL, E.P.; HENNEMAN, D.H. Blood glutathione level in mental disease before and after treatment. **AMA Arch Neurol Psychiatry.** v. 67, p. 64-8, 1952.
- ANGST, J., ANGST, F.; STASSEN, H.H. Suicide risk in patients with major depressive disorder. **J Clin Psychiatry.** v. 60 Suppl 2, p. 57-62; discussion 75-6, 113-6, 1999.
- ANISMAN, H., RAVINDRAN, A.V., GRIFFITHS, J.; MERALI, Z. Interleukin-1 beta production in dysthymia before and after pharmacotherapy. **Biol Psychiatry.** v. 46, p. 1649-55, 1999.

- AXELROD, J., WHITBY, L.G.; HERTTING, G. Effect of psychotropic drugs on the uptake of H3-norepinephrine by tissues. **Science**. v. 133, p. 383-4, 1961.
- BAMBICO, F.R., KATZ, N., DEBONNEL, G.; GOBBI, G. Cannabinoids elicit antidepressant-like behavior and activate serotonergic neurons through the medial prefrontal cortex. **J Neurosci**. v. 27, p. 11700-11, 2007.
- BELL, C., ABRAMS, J.; NUTT, D. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. **Br J Psychiatry**. v. 178, p. 399-405, 2001.
- BERK, M., COPOLOV, D.L., DEAN, O., LU, K., JEAVONS, S., SCHAPKAITZ, I., ANDERSON-HUNT, M.; BUSH, A.I. N-acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder--a double-blind randomized placebo-controlled trial. **Biol Psychiatry**. v. 64, p. 468-75, 2008a.
- BERK, M., NG, F., DEAN, O., DODD, S.; BUSH, A.I. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. **Trends Pharmacol Sci**. v. 29, p. 346-51, 2008b.
- BERMAN, R.M., CAPPIELLO, A., ANAND, A., OREN, D.A., HENINGER, G.R., CHARNEY, D.S.; KRYSTAL, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**. v. 47, p. 351-4, 2000.
- BERTELTSEN, A., HARVALD, B.; HAUGE, M. A Danish twin study of manic-depressive disorders. **Br J Psychiatry**. v. 130, p. 330-51, 1977.
- BESSA, J.M., FERREIRA, D., MELO, I., MARQUES, F., CERQUEIRA, J.J., PALHA, J.A., ALMEIDA, O.F.; SOUSA, N. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. **Mol Psychiatry**. v. 14, p. 764-73, 739, 2009.
- BILICI, M., EFE, H., KOROGLU, M.A., UYDU, H.A., BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord**. v. 64, p. 43-51, 2001.
- BIRNSTIEL, S.; HAAS, H.L. Acute effects of antidepressant drugs on long-term potentiation (LTP) in rat hippocampal slices. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v. 344, p. 79-83, 1991.
- BLISS, T.V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol**. v. 232, p. 331-56, 1973.
- BOYD, Z.S., KRIATCHKO, A., YANG, J., AGARWAL, N., WAX, M.B.; PATIL, R.V. Interleukin-10 receptor signaling through STAT-3 regulates the apoptosis of retinal ganglion cells in response to stress. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v. 44, p. 5206-11, 2003.

- BROWN, E.S., RUSH, A.J.; MCEWEN, B.S. Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. **Neuropsychopharmacology**. v. 21, p. 474-84, 1999.
- BURIGO, M., ROZA, C.A., BASSANI, C., FAGUNDES, D.A., REZIN, G.T., FEIER, G., DAL-PIZZOL, F., QUEVEDO, J.; STRECK, E.L. Effect of electroconvulsive shock on mitochondrial respiratory chain in rat brain. **Neurochem Res**. v. 31, p. 1375-9, 2006.
- BUSTELO, X.R., SAUZEAU, V.; BERENJENO, I.M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. **Bioessays**. v. 29, p. 356-70, 2007.
- BYRUM, C.E., AHEARN, E.P.; KRISHNAN, K.R. A neuroanatomic model for depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 23, p. 175-93, 1999.
- CAMP, N.J.; CANNON-ALBRIGHT, L.A. Dissecting the genetic etiology of major depressive disorder using linkage analysis. **Trends Mol Med**. v. 11, p. 138-44, 2005.
- CAMP, N.J., LOWRY, M.R., RICHARDS, R.L., PLENK, A.M., CARTER, C., HENSEL, C.H., ABKEVICH, V., SKOLNICK, M.H., SHATTUCK, D., ROWE, K.G., HUGHES, D.C.; CANNON-ALBRIGHT, L.A. Genome-wide linkage analyses of extended Utah pedigrees identifies loci that influence recurrent, early-onset major depression and anxiety disorders. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**. v. 135B, p. 85-93, 2005.
- CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. **J Psychiatry Neurosci**. v. 29, p. 417-26, 2004.
- CAMPBELL, S., MARRIOTT, M., NAHMIAS, C.; MACQUEEN, G.M. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. **Am J Psychiatry**. v. 161, p. 598-607, 2004.
- CANLI, T.; LESCH, K.P. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. **Nat Neurosci**. v. 10, p. 1103-9, 2007.
- CARLEZON, W.A., JR., DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. The many faces of CREB. **Trends Neurosci**. v. 28, p. 436-45, 2005.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effect Of Chlorpromazine Or Haloperidol On Formation Of 3methoxytyramine And Normetanephine In Mouse Brain. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)**. v. 20, p. 140-4, 1963.
- CASPI, A., SUGDEN, K., MOFFITT, T.E., TAYLOR, A., CRAIG, I.W., HARRINGTON, H., MCCLAY, J., MILL, J., MARTIN, J., BRAITHWAITE, A.; POULTON, R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**. v. 301, p. 386-9, 2003.
- CASTREN, E. Is mood chemistry? **Nat Rev Neurosci**. v. 6, p. 241-6, 2005.

- CASTREN, E., VOIKAR, V.; RANTAMAKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Curr Opin Pharmacol.** v. 7, p. 18-21, 2007.
- CHANG, F., STEELMAN, L.S., SHELTON, J.G., LEE, J.T., NAVOLANIC, P.M., BLALOCK, W.L., FRANKLIN, R.; MCCUBREY, J.A. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). **Int J Oncol.** v. 22, p. 469-80, 2003.
- CHEN, T.J., GEHLER, S., SHAW, A.E., BAMBURG, J.R.; LETOURNEAU, P.C. Cdc42 participates in the regulation of ADF/cofilin and retinal growth cone filopodia by brain derived neurotrophic factor. **J Neurobiol.** v. 66, p. 103-14, 2006.
- CHUNG, H., SEO, S., MOON, M.; PARK, S. Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 beta and ERK1/2 pathways mediate protective effects of acylated and unacylated ghrelin against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis in primary rat cortical neuronal cells. **J Endocrinol.** v. 198, p. 511-21, 2008.
- CLEETER, M.W., COOPER, J.M., DARLEY-USMAR, V.M., MONCADA, S.; SCHAPIRA, A.H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Lett.** v. 345, p. 50-4, 1994.
- CONNOR, T.J.; LEONARD, B.E. Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. **Life Sci.** v. 62, p. 583-606, 1998.
- CONTI, B., MAIER, R., BARR, A.M., MORALE, M.C., LU, X., SANNA, P.P., BILBE, G., HOYER, D.; BARTFAI, T. Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electro convulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine. **Mol Psychiatry.** v. 12, p. 167-89, 2007.
- COSTA, V.M., SILVA, R., FERREIRA, R., AMADO, F., CARVALHO, F., DE LOURDES BASTOS, M., CARVALHO, R.A., CARVALHO, M.; REMIAO, F. Adrenaline in pro-oxidant conditions elicits intracellular survival pathways in isolated rat cardiomyocytes. **Toxicology.** v. 257, p. 70-9, 2009a.
- COSTA, V.M., SILVA, R., TAVARES, L.C., VITORINO, R., AMADO, F., CARVALHO, F., BASTOS MDE, L., CARVALHO, M., CARVALHO, R.A.; REMIAO, F. Adrenaline and reactive oxygen species elicit proteome and energetic metabolism modifications in freshly isolated rat cardiomyocytes. **Toxicology.** v. 260, p. 84-96, 2009b.
- COVINGTON, H.E., 3RD, MAZE, I., LAPLANT, Q.C., VIALOU, V.F., OHNISHI, Y.N., BERTON, O., FASS, D.M., RENTHAL, W., RUSH, A.J., 3RD, WU, E.Y., GHOSE, S., KRISHNAN, V., RUSSO, S.J., TAMMINGA, C., HAGGARTY, S.J.; NESTLER, E.J. Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. **J Neurosci.** v. 29, p. 11451-60, 2009.

- CRYAN, J.F., MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci.** v. 23, p. 238-45, 2002.
- DATSON, N.A., MORSINK, M.C., MEIJER, O.C.; DE KLOET, E.R. Central corticosteroid actions: Search for gene targets. **Eur J Pharmacol.** v. 583, p. 272-89, 2008.
- DATSON, N.A., VAN DER PERK, J., DE KLOET, E.R.; VREUGDENHIL, E. Expression profile of 30,000 genes in rat hippocampus using SAGE. **Hippocampus.** v. 11, p. 430-44, 2001a.
- DATSON, N.A., VAN DER PERK, J., DE KLOET, E.R.; VREUGDENHIL, E. Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. **Eur J Neurosci.** v. 14, p. 675-89, 2001b.
- DAVIES, C.H., CLARKE, V.R., JANE, D.E.; COLLINGRIDGE, G.L. Pharmacology of postsynaptic metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. **Br J Pharmacol.** v. 116, p. 1859-69, 1995.
- DE KLOET, E.R., JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci.** v. 6, p. 463-75, 2005.
- DELGADO, P.L., PRICE, L.H., MILLER, H.L., SALOMON, R.M., AGHAJANIAN, G.K., HENINGER, G.R.; CHARNEY, D.S. Serotonin and the neurobiology of depression. Effects of tryptophan depletion in drug-free depressed patients. **Arch Gen Psychiatry.** v. 51, p. 865-74, 1994.
- DETKE, M.J., JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Exp Clin Psychopharmacol.** v. 5, p. 107-12, 1997.
- DOYLE, C., HOLSCHER, C., ROWAN, M.J.; ANWYL, R. The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitro-indazole blocks both long-term potentiation and depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. **J Neurosci.** v. 16, p. 418-24, 1996.
- DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biol Psychiatry.** v. 59, p. 1136-43, 2006.
- DREVETS, W.C. Functional neuroimaging studies of depression: the anatomy of melancholia. **Annu Rev Med.** v. 49, p. 341-61, 1998.
- DREVETS, W.C., PRICE, J.L.; FUREY, M.L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Struct Funct.** v. 213, p. 93-118, 2008.

- DREVETS, W.C., VIDEEN, T.O., PRICE, J.L., PRESKORN, S.H., CARMICHAEL, S.T.; RAICHLE, M.E. A functional anatomical study of unipolar depression. **J Neurosci.** v. 12, p. 3628-41, 1992.
- DRIGUES, N., POLTYREV, T., BEJAR, C., WEINSTOCK, M.; YODIM, M.B. cDNA gene expression profile of rat hippocampus after chronic treatment with antidepressant drugs. **J Neural Transm.** v. 110, p. 1413-36, 2003.
- EREN, I., NAZIROGLU, M.; DEMIRDAS, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochem Res.** v. 32, p. 1188-95, 2007.
- ERIKSSON, P.S., PERFILIEVA, E., BJORK-ERIKSSON, T., ALBORN, A.M., NORDBORG, C., PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med.** v. 4, p. 1313-7, 1998.
- FERREIRA, F.R., BIOJONE, C., JOCA, S.R.; GUIMARAES, F.S. Antidepressant-like effects of N-acetyl-L-cysteine in rats. **Behav Pharmacol.** v. 19, p. 747-50, 2008.
- FOSTER, M.W., HESS, D.T.; STAMLER, J.S. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. **Trends Mol Med.** v., 2009.
- FRODL, T., MEISENZAHN, E., ZETZSCHE, T., BOTTLENDER, R., BORN, C., GROLL, C., JAGER, M., LEINSINGER, G., HAHN, K.; MOLLER, H.J. Enlargement of the amygdala in patients with a first episode of major depression. **Biol Psychiatry.** v. 51, p. 708-14, 2002.
- GAETANI, S., DIPASQUALE, P., ROMANO, A., RIGHETTI, L., CASSANO, T., PIOMELLI, D.; CUOMO, V. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic and antidepressant drugs. **Int Rev Neurobiol.** v. 85, p. 57-72, 2009.
- GAMARO, G.D., STRECK, E.L., MATTE, C., PREDIGER, M.E., WYSE, A.T.; DALMAZ, C. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem Res.** v. 28, p. 1339-44, 2003.
- GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature.** v. 336, p. 385-8, 1988.
- GARTHWAITE, J., GARTHWAITE, G., PALMER, R.M.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur J Pharmacol.** v. 172, p. 413-6, 1989.
- GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell.** v. 109 Suppl, p. S81-96, 2002.

- GOBBI, G., BAMBICO, F.R., MANGIERI, R., BORTOLATO, M., CAMPOLONGO, P., SOLINAS, M., CASSANO, T., MORGESE, M.G., DEBONNEL, G., DURANTI, A., TONTINI, A., TARZIA, G., MOR, M., TREZZA, V., GOLDBERG, S.R., CUOMO, V.; PIOMELLI, D. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 102, p. 18620-5, 2005.
- GOSHEN, I., KREISEL, T., BEN-MENACHEM-ZIDON, O., LICHT, T., WEIDENFELD, J., BEN-HUR, T.; YIRMIYA, R. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. **Mol Psychiatry.** v. 13, p. 717-28, 2008.
- GUBBA, E.M., NETHERTON, C.M.; HERBERT, J. Endangerment of the brain by glucocorticoids: experimental and clinical evidence. **J Neurocytol.** v. 29, p. 439-49, 2000.
- GUO, Z., JIANG, H., XU, X., DUAN, W.; MATTSO, M.P. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. **J Biol Chem.** v. 283, p. 1754-63, 2008.
- HAJSZAN, T., DOW, A., WARNER-SCHMIDT, J.L., SZIGETI-BUCK, K., SALLAM, N.L., PARDUCZ, A., LERANTH, C.; DUMAN, R.S. Remodeling of hippocampal spine synapses in the rat learned helplessness model of depression. **Biol Psychiatry.** v. 65, p. 392-400, 2009.
- HAMET, P.; TREMBLAY, J. Genetics and genomics of depression. **Metabolism.** v. 54, p. 10-5, 2005.
- HARVEY, B.H., JOUBERT, C., DU PREEZ, J.L.; BERK, M. Effect of chronic N-acetyl cysteine administration on oxidative status in the presence and absence of induced oxidative stress in rat striatum. **Neurochem Res.** v. 33, p. 508-17, 2008.
- HARVEY, J.J. An Unidentified Virus Which Causes The Rapid Production Of Tumours In Mice. **Nature.** v. 204, p. 1104-5, 1964.
- HASHIMOTODANI, Y., OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. **Neuroscientist.** v. 13, p. 127-37, 2007.
- HEIBERG, I.L., WEGENER, G.; ROSENBERG, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behav Brain Res.** v. 134, p. 479-84, 2002.
- HERKEN, H., GUREL, A., SELEK, S., ARMUTCU, F., OZEN, M.E., BULUT, M., KAP, O., YUMRU, M., SAVAS, H.A.; AKYOL, O. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Arch Med Res.** v. 38, p. 247-52, 2007.

- HERMAN, J.P., SCHAFER, M.K., YOUNG, E.A., THOMPSON, R., DOUGLASS, J., AKIL, H.; WATSON, S.J. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **J Neurosci.** v. 9, p. 3072-82, 1989.
- HESS, D.T., MATSUMOTO, A., KIM, S.O., MARSHALL, H.E.; STAMLER, J.S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 6, p. 150-66, 2005.
- HILL, M.N., CARRIER, E.J., HO, W.S., SHI, L., PATEL, S., GORZALKA, B.B.; HILLARD, C.J. Prolonged glucocorticoid treatment decreases cannabinoid CB1 receptor density in the hippocampus. **Hippocampus.** v. 18, p. 221-6, 2008.
- HILL, M.N.; GORZALKA, B.B. Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. **Eur Neuropsychopharmacol.** v. 15, p. 593-9, 2005.
- HILL, M.N., HO, W.S., SINOPOLI, K.J., VIAU, V., HILLARD, C.J.; GORZALKA, B.B. Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Neuropsychopharmacology.** v. 31, p. 2591-9, 2006.
- HILL, M.N., PATEL, S., CARRIER, E.J., RADEMACHER, D.J., ORMEROD, B.K., HILLARD, C.J.; GORZALKA, B.B. Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. **Neuropsychopharmacology.** v. 30, p. 508-15, 2005.
- HIRSCHFELD, R.M. Efficacy of SSRIs and newer antidepressants in severe depression: comparison with TCAs. **J Clin Psychiatry.** v. 60, p. 326-35, 1999.
- HOLDEN, C. Depression: the news isn't depressing. **Science.** v. 254, p. 1450-2, 1991.
- HOLDERBACH, R., CLARK, K., MOREAU, J.L., BISCHOFBERGER, J.; NORMANN, C. Enhanced long-term synaptic depression in an animal model of depression. **Biol Psychiatry.** v. 62, p. 92-100, 2007.
- HOLICK, K.A., LEE, D.C., HEN, R.; DULAWA, S.C. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. **Neuropsychopharmacology.** v. 33, p. 406-17, 2008.
- HUANG, G.J., BANNERMAN, D.; FLINT, J. Chronic fluoxetine treatment alters behavior, but not adult hippocampal neurogenesis, in BALB/cJ mice. **Mol Psychiatry.** v. 13, p. 119-21, 2008.
- INSEL, T.R.; LEHNER, T. A new era in psychiatric genetics? **Biol Psychiatry.** v. 61, p. 1017-8, 2007.

- IZZO, A.A., BORRELLI, F., CAPASSO, R., DI MARZO, V.; MECHOULAM, R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends Pharmacol Sci.** v., 2009.
- JEFFERYS, D.; FUNDER, J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. **Eur J Pharmacol.** v. 295, p. 131-5, 1996.
- JOCA, S.R., FERREIRA, F.R.; GUIMARAES, F.S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitroergic neurotransmitter systems. **Stress.** v. 10, p. 227-49, 2007.
- JOCA, S.R.; GUIMARAES, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology (Berl).** v. 185, p. 298-305, 2006.
- JOU, S.H., CHIU, N.Y.; LIU, C.S. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. **Chang Gung Med J.** v. 32, p. 370-9, 2009.
- KALTSCHMIDT, B., WIDERA, D.; KALTSCHMIDT, C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. **Biochim Biophys Acta.** v. 1745, p. 287-99, 2005.
- KAMSLER, A.; SEGAL, M. Hydrogen peroxide modulation of synaptic plasticity. **J Neurosci.** v. 23, p. 269-76, 2003.
- KENDLER, K.S., KARKOWSKI, L.M.; PRESCOTT, C.A. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. **Am J Psychiatry.** v. 156, p. 837-41, 1999.
- KENDLER, K.S., KUHN, J.W., VITTUM, J., PRESCOTT, C.A.; RILEY, B. The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. **Arch Gen Psychiatry.** v. 62, p. 529-35, 2005.
- KESSLER, R.C. The effects of stressful life events on depression. **Annu Rev Psychol.** v. 48, p. 191-214, 1997.
- KHAIROVA, R.A., MACHADO-VIEIRA, R., DU, J.; MANJI, H.K. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. **Int J Neuropsychopharmacol.** v. 12, p. 561-78, 2009.
- KHAWAJA, X., XU, J., LIANG, J.J.; BARRETT, J.E. Proteomic analysis of protein changes developing in rat hippocampus after chronic antidepressant treatment: Implications for depressive disorders and future therapies. **J Neurosci Res.** v. 75, p. 451-60, 2004.
- KIM, J.J.; DIAMOND, D.M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nat Rev Neurosci.** v. 3, p. 453-62, 2002.

- KIM, W.K., CHOI, Y.B., RAYUDU, P.V., DAS, P., ASAAD, W., ARNELLE, D.R., STAMLER, J.S.; LIPTON, S.A. Attenuation of NMDA receptor activity and neurotoxicity by nitroxyl anion, NO. **Neuron**. v. 24, p. 461-9, 1999.
- KNUCKEY, N.W., PALM, D., PRIMIANO, M., EPSTEIN, M.H.; JOHANSON, C.E. N-acetylcysteine enhances hippocampal neuronal survival after transient forebrain ischemia in rats. **Stroke**. v. 26, p. 305-10; discussion 311, 1995.
- KOENIGS, M.; GRAFMAN, J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. **Behav Brain Res**. v. 201, p. 239-43, 2009.
- KOHEN, R., KIROV, S., NAVAJA, G.P., HAPPE, H.K., HAMBLIN, M.W., SNODDY, J.R., NEUMAIER, J.F.; PETTY, F. Gene expression profiling in the hippocampus of learned helpless and nonhelpless rats. **Pharmacogenomics J**. v. 5, p. 278-91, 2005.
- KOPIN, I.J. Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. **Pharmacol Rev**. v. 37, p. 333-64, 1985.
- KRAY, A.E., CARTER, R.S., PENNINGTON, K.N., GOMEZ, R.J., SANDERS, L.E., LLANES, J.M., KHAN, W.N., BALLARD, D.W.; WADZINSKI, B.E. Positive regulation of IkappaB kinase signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A. **J Biol Chem**. v. 280, p. 35974-82, 2005.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**. v. 455, p. 894-902, 2008.
- KUHN, R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). **Am J Psychiatry**. v. 115, p. 459-64, 1958.
- LAYER, R.T., POPIK, P., OLDS, T.; SKOLNICK, P. Antidepressant-like actions of the polyamine site NMDA antagonist, eliprodil (SL-82.0715). **Pharmacol Biochem Behav**. v. 52, p. 621-7, 1995.
- LENAZ, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. **IUBMB Life**. v. 52, p. 159-64, 2001.
- LEVINSON, D.F., EVGRAFOV, O.V., KNOWLES, J.A., POTASH, J.B., WEISSMAN, M.M., SCHEFTNER, W.A., DEPAULO, J.R., JR., CROWE, R.R., MURPHY-EBERENZ, K., MARTA, D.H., MCINNIS, M.G., ADAMS, P., GLADIS, M., MILLER, E.B., THOMAS, J.; HOLMANS, P. Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): significant linkage on chromosome 15q25-q26 after fine mapping with single nucleotide polymorphism markers. **Am J Psychiatry**. v. 164, p. 259-64, 2007.

- LI, Q., ZHANG, R., GUO, Y.L.; MEI, Y.W. Effect of neuregulin on apoptosis and expressions of STAT3 and GFAP in rats following cerebral ischemic reperfusion. **J Mol Neurosci.** v. 37, p. 67-73, 2009.
- LI, X., TIZZANO, J.P., GRIFFEY, K., CLAY, M., LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). **Neuropharmacology.** v. 40, p. 1028-33, 2001.
- LIZASOAIN, I., MORO, M.A., KNOWLES, R.G., DARLEY-USMAR, V.; MONCADA, S. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. **Biochem J.** v. 314 (Pt 3), p. 877-80, 1996.
- LLEDO, P.M., ALONSO, M.; GRUBB, M.S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nat Rev Neurosci.** v. 7, p. 179-93, 2006.
- LOPEZ-LEON, S., JANSSENS, A.C., GONZALEZ-ZULOETA LADD, A.M., DEL-FAVERO, J., CLAES, S.J., OOSTRA, B.A.; VAN DUIJN, C.M. Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. **Mol Psychiatry.** v. 13, p. 772-85, 2008.
- LOPEZ, A.D.; MURRAY, C.C. The global burden of disease, 1990-2020. **Nat Med.** v. 4, p. 1241-3, 1998.
- LU, Y.F., KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. **J Neurosci.** v. 19, p. 10250-61, 1999.
- LUPIEN, S.J.; MCEWEN, B.S. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. **Brain Res Brain Res Rev.** v. 24, p. 1-27, 1997.
- LUTZ, B. Endocannabinoid signals in the control of emotion. **Curr Opin Pharmacol.** v. 9, p. 46-52, 2009.
- MAALOUF, M.; RHO, J.M. Oxidative impairment of hippocampal long-term potentiation involves activation of protein phosphatase 2A and is prevented by ketone bodies. **J Neurosci Res.** v. 86, p. 3322-30, 2008.
- MACHADO-VIEIRA, R., MANJI, H.K.; ZARATE, C.A. The Role of the Tripartite Glutamatergic Synapse in the Pathophysiology and Therapeutics of Mood Disorders. **Neuroscientist.** v., 2009.
- MADRIGAL, J.L., OLIVENZA, R., MORO, M.A., LIZASOAIN, I., LORENZO, P., RODRIGO, J.; LEZA, J.C. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. **Neuropsychopharmacology.** v. 24, p. 420-9, 2001.

- MAGARINOS, A.M.; MCEWEN, B.S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. **Neuroscience**. v. 69, p. 89-98, 1995.
- MALBERG, J.E., EISCH, A.J., NESTLER, E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci**. v. 20, p. 9104-10, 2000.
- MANJI, H.K., DREVETS, W.C.; CHARNEY, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nat Med**. v. 7, p. 541-7, 2001.
- MARAI, L., HATTINGH, S.M., STEIN, D.J.; DANIELS, W.M. A proteomic analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and escitalopram treatment. **Metab Brain Dis**. v., 2009.
- MARTINEZ-TURRILLAS, R., FRECHILLA, D.; DEL RIO, J. Chronic antidepressant treatment increases the membrane expression of AMPA receptors in rat hippocampus. **Neuropharmacology**. v. 43, p. 1230-7, 2002.
- MATHEW, S.J., KEEGAN, K.; SMITH, L. Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders. **Rev Bras Psiquiatr**. v. 27, p. 243-8, 2005.
- MAYER, A., SZASZ, B.K.; KISS, J.P. Inhibitory effect of antidepressants on the NMDA-evoked [(3)H]noradrenaline release from rat hippocampal slices. **Neurochem Int**. v. 55, p. 383-8, 2009.
- MCEWEN, B.S., CHATTARJI, S., DIAMOND, D.M., JAY, T.M., REAGAN, L.P., SVENNINGSSON, P.; FUCHS, E. The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. **Mol Psychiatry**. v., 2009.
- MCHUGH, P., ROGERS, G., GLUBB, D., JOYCE, P.; KENNEDY, M. Proteomic analysis of rat hippocampus exposed to the antidepressant paroxetine. **J Psychopharmacol**. v., 2009.
- MCKINNEY, W.T., JR., EISING, R.G., MORAN, E.C., SUOMI, S.J.; HARLOW, H.F. Effects of reserpine on the social behavior of rhesus monkeys. **Dis Nerv Syst**. v. 32, p. 735-41, 1971.
- MCLAUGHLIN, R.J., HILL, M.N., MORRISH, A.C.; GORZALKA, B.B. Local enhancement of cannabinoid CB1 receptor signalling in the dorsal hippocampus elicits an antidepressant-like effect. **Behav Pharmacol**. v. 18, p. 431-8, 2007.
- MCNALLY, L., BHAGWAGAR, Z.; HANNESTAD, J. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. **CNS Spectr**. v. 13, p. 501-10, 2008.

- MEFFERT, M.K.; BALTIMORE, D. Physiological functions for brain NF-kappaB. **Trends Neurosci.** v. 28, p. 37-43, 2005.
- MILL, J.; PETRONIS, A. Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. **Mol Psychiatry.** v. 12, p. 799-814, 2007.
- MIYAMOTO, E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. **J Pharmacol Sci.** v. 100, p. 433-42, 2006.
- MIZOGUCHI, K., ISHIGE, A., ABURADA, M.; TABIRA, T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience.** v. 119, p. 887-97, 2003.
- MORSINK, M.C., STEENBERGEN, P.J., VOS, J.B., KARST, H., JOELS, M., DE KLOET, E.R.; DATSON, N.A. Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. **J Neuroendocrinol.** v. 18, p. 239-52, 2006.
- MU, J., XIE, P., YANG, Z.S., YANG, D.L., LV, F.J., LUO, T.Y.; LI, Y. Neurogenesis and major depression: implications from proteomic analyses of hippocampal proteins in a rat depression model. **Neurosci Lett.** v. 416, p. 252-6, 2007.
- MULLER, N.; ACKENHEIL, M. Psychoneuroimmunology and the cytokine action in the CNS: implications for psychiatric disorders. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 22, p. 1-33, 1998.
- MULLER, N., SCHWARZ, M.J., DEHNING, S., DOUHE, A., CEROVECKI, A., GOLDSTEIN-MULLER, B., SPELLMANN, I., HETZEL, G., MAINO, K., KLEINDIENST, N., MOLLER, H.J., AROLT, V.; RIEDEL, M. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib has therapeutic effects in major depression: results of a double-blind, randomized, placebo controlled, add-on pilot study to reboxetine. **Mol Psychiatry.** v. 11, p. 680-4, 2006.
- MURASE, K., RANDIC, M., SHIRASAKI, T., NAKAGAWA, T.; AKAIKE, N. Serotonin suppresses N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated spinal dorsal horn neurons of the rat. **Brain Res.** v. 525, p. 84-91, 1990.
- NAKATANI, N., ABURATANI, H., NISHIMURA, K., SEMBA, J.; YOSHIKAWA, T. Comprehensive expression analysis of a rat depression model. **Pharmacogenomics J.** v. 4, p. 114-26, 2004.
- NELSON, E.J., CONNOLLY, J.; MCARTHUR, P. Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. **Biol Cell.** v. 95, p. 3-8, 2003.
- NESTLER, E.J. Antidepressant treatments in the 21st century. **Biol Psychiatry.** v. 44, p. 526-33, 1998.

- NG, F., BERK, M., DEAN, O.; BUSH, A.I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **Int J Neuropsychopharmacol.** v. 11, p. 851-76, 2008.
- NICKOLS, J.C., VALENTINE, W., KANWAL, S.; CARTER, B.D. Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. **Nat Neurosci.** v. 6, p. 161-7, 2003.
- NUNES, C., ALMEIDA, L.; LARANJINHA, J. Synergistic inhibition of respiration in brain mitochondria by nitric oxide and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). Implications for Parkinson's disease. **Neurochem Int.** v. 47, p. 173-82, 2005.
- O'DELL, T.J., HAWKINS, R.D., KANDEL, E.R.; ARANCIO, O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 88, p. 11285-9, 1991.
- O'KANE, E.M., STONE, T.W.; MORRIS, B.J. Increased long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus via modulation of GTPase signalling or inhibition of Rho kinase. **Neuropharmacology.** v. 46, p. 879-87, 2004.
- PADOVAN, C.M.; GUIMARAES, F.S. Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 77, p. 15-9, 2004.
- PAL, S.N.; DANDIYA, P.C. Glutathione as a cerebral substrate in depressive behavior. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 48, p. 845-51, 1994.
- PAPAKOSTAS, G.I., FAVA, M.; THASE, M.E. Treatment of SSRI-resistant depression: a meta-analysis comparing within- versus across-class switches. **Biol Psychiatry.** v. 63, p. 699-704, 2008.
- PARIANTE, C.M.; LIGHTMAN, S.L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci.** v. 31, p. 464-8, 2008.
- PARIANTE, C.M., MAKOFF, A., LOVESTONE, S., FEROLI, S., HEYDEN, A., MILLER, A.H.; KERWIN, R.W. Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function in vitro by modulating the membrane steroid transporters. **Br J Pharmacol.** v. 134, p. 1335-43, 2001.
- PARK, J.S., LI, Y.F.; BAI, Y. Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation. **Biochim Biophys Acta.** v. 1772, p. 533-42, 2007.
- PAUL, I.A.; SKOLNICK, P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1003, p. 250-72, 2003.

- PEETERS, B.W.; BROEKKAMP, C.L. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 49, p. 417-27, 1994.
- PETERSEN, A., WORTWEIN, G., GRUBER, S.H., EL-KHOURY, A.; MATHE, A.A. Nortriptyline mediates behavioral effects without affecting hippocampal cytogenesis in a genetic rat depression model. **Neurosci Lett.** v. 451, p. 148-51, 2009.
- PICCIOLI, P., PORCILE, C., STANZIONE, S., BISAGLIA, M., BAJETTO, A., BONAVIA, R., FLORIO, T.; SCHETTINI, G. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation induces apoptosis in cerebellar granule cells. **J Neurosci Res.** v. 66, p. 1064-73, 2001.
- PILC, A., BRANSKI, P., PALUCHA, A., TOKARSKI, K.; BIJAK, M. Antidepressant treatment influences group I of glutamate metabotropic receptors in slices from hippocampal CA1 region. **Eur J Pharmacol.** v. 349, p. 83-7, 1998.
- PINEYRO, G.; BLIER, P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. **Pharmacol Rev.** v. 51, p. 533-91, 1999.
- PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nat Rev Neurosci.** v. 4, p. 873-84, 2003.
- PORSOLT, R.D., BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther.** v. 229, p. 327-36, 1977.
- POZNIAK, C.D.; PLEASURE, S.J. Genetic control of hippocampal neurogenesis. **Genome Biol.** v. 7, p. 207, 2006.
- PRICE, J.L. Comparative aspects of amygdala connectivity. **Ann N Y Acad Sci.** v. 985, p. 50-8, 2003.
- PRICE, J.L.; DREVETS, W.C. Neurocircuitry of Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology.** v., 2009.
- PRICE, L.H., MALISON, R.T., MCDOUGLE, C.J., MCCANCE-KATZ, E.F., OWEN, K.R.; HENINGER, G.R. Neurobiology of tryptophan depletion in depression: effects of m-chlorophenylpiperazine (mCPP). **Neuropsychopharmacology.** v. 17, p. 342-50, 1997.
- RAINER, J.D. Genetic aspects of depression. **Can Psychiatr Assoc J.** v. 11 Suppl, p. Suppl:29-33, 1966.
- RAISMAN, R., BRILEY, M.; LANGER, S.Z. Specific tricyclic antidepressant binding sites in rat brain. **Nature.** v. 281, p. 148-50, 1979.

- RAISON, C.L., CAPURON, L.; MILLER, A.H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol.** v. 27, p. 24-31, 2006.
- REX, A., SCHICKERT, R.; FINK, H. Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide in the forced swim test in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 77, p. 303-7, 2004.
- REX, C.S., CHEN, L.Y., SHARMA, A., LIU, J., BABAYAN, A.H., GALL, C.M.; LYNCH, G. Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. **J Cell Biol.** v. 186, p. 85-97, 2009.
- REYNOLDS, I.J.; MILLER, R.J. Tricyclic antidepressants block N-methyl-D-aspartate receptors: similarities to the action of zinc. **Br J Pharmacol.** v. 95, p. 95-102, 1988.
- REZIN, G.T., CARDOSO, M.R., GONCALVES, C.L., SCAINI, G., FRAGA, D.B., RIEGEL, R.E., COMIM, C.M., QUEVEDO, J.; STRECK, E.L. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem Int.** v. 53, p. 395-400, 2008.
- RIVAS-ARANCIBIA, S., GUEVARA-GUZMAN, R., LOPEZ-VIDAL, Y., RODRIGUEZ-MARTINEZ, E., GOMES, M.Z., ANGOA-PEREZ, M.; RAISMAN-VOZARI, R. Oxidative Stress Caused by Ozone Exposure Induces Loss of Brain Repair in The Hippocampus of Adult Rats. **Toxicol Sci.** v., 2009.
- RUHE, H.G., MASON, N.S.; SCHENE, A.H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. **Mol Psychiatry.** v. 12, p. 331-59, 2007.
- SACHAR, E.J.; BARON, M. The biology of affective disorders. **Annu Rev Neurosci.** v. 2, p. 505-17, 1979.
- SALZER, H.M.; LURIE, M.L. Anxiety and depressive states treated with isonicotinyl hydrazide (isoniazid). **AMA Arch Neurol Psychiatry.** v. 70, p. 317-24, 1953.
- SALZER, H.M.; LURIE, M.L. Depressive states treated with isonicotinyl hydrazide (isoniazid); a follow-up study. **Ohio Med.** v. 51, p. 437-41, 1955.
- SANTARELLI, L., SAXE, M., GROSS, C., SURGET, A., BATTAGLIA, F., DULAWA, S., WEISSTAUB, N., LEE, J., DUMAN, R., ARANCIO, O., BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science.** v. 301, p. 805-9, 2003.
- SARANDOL, A., SARANDOL, E., EKER, S.S., ERDINC, S., VATANSEVER, E.; KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. **Hum Psychopharmacol.** v. 22, p. 67-73, 2007.

- SARNICO, I., LANZILLOTTA, A., BENARESE, M., ALGHISI, M., BAIGUERA, C., BATTISTIN, L., SPANO, P.; PIZZI, M. NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. **Int Rev Neurobiol.** v. 85, p. 351-62, 2009.
- SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry.** v. 122, p. 509-22, 1965.
- SELIKOFF, I.J.; ROBITZEK, E.H. Tuberculosis chemotherapy with hydrazine derivatives of isonicotinic acid. **Dis Chest.** v. 21, p. 385-438, 1952.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.** v. 10, p. 230-1, 1998.
- SEMINOWICZ, D.A., MAYBERG, H.S., MCINTOSH, A.R., GOLDAPPLE, K., KENNEDY, S., SEGAL, Z.; RAFI-TARI, S. Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis. **Neuroimage.** v. 22, p. 409-18, 2004.
- SEO, B.B., MARELLA, M., YAGI, T.; MATSUNO-YAGI, A. The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. **FEBS Lett.** v. 580, p. 6105-8, 2006.
- SEQUEIRA, A., KLEMPAN, T., CANETTI, L., FFRENCH-MULLEN, J., BENKELFAT, C., ROULEAU, G.A.; TURECKI, G. Patterns of gene expression in the limbic system of suicides with and without major depression. **Mol Psychiatry.** v. 12, p. 640-55, 2007.
- SHELINE, Y.I., BARCH, D.M., DONNELLY, J.M., OLLINGER, J.M., SNYDER, A.Z.; MINTUN, M.A. Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. **Biol Psychiatry.** v. 50, p. 651-8, 2001.
- SHIODA, N., HAN, F.; FUKUNAGA, K. Role of Akt and ERK signaling in the neurogenesis following brain ischemia. **Int Rev Neurobiol.** v. 85, p. 375-87, 2009.
- SHIRAYAMA, Y., CHEN, A.C., NAKAGAWA, S., RUSSELL, D.S.; DUMAN, R.S. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J Neurosci.** v. 22, p. 3251-61, 2002.
- SHORS, T.J., MIESEGAES, G., BEYLIN, A., ZHAO, M., RYDEL, T.; GOULD, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature.** v. 410, p. 372-6, 2001.
- SMIALOWSKA, M., SZEWCZYK, B., BRANSKI, P., WIERONSKA, J.M., PALUCHA, A., BAJKOWSKA, M.; PILC, A. Effect of chronic imipramine or electroconvulsive shock on the expression of mGluR1a and mGluR5a immunoreactivity in rat brain hippocampus. **Neuropharmacology.** v. 42, p. 1016-23, 2002.

- SMITH, J.A. The use of the isopropyl derivative of isonicotinylhydrazine (marsilid) in the treatment of mental disease; a preliminary report. **Am Pract Dig Treat.** v. 4, p. 519-20, 1953.
- SNYDER, J.S., HONG, N.S., MCDONALD, R.J.; WOJTOWICZ, J.M. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. **Neuroscience.** v. 130, p. 843-52, 2005.
- SOUSA, N., LUKOYANOV, N.V., MADEIRA, M.D., ALMEIDA, O.F.; PAULA-BARBOSA, M.M. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. **Neuroscience.** v. 97, p. 253-66, 2000.
- SU, B., WANG, X., ZHENG, L., PERRY, G., SMITH, M.A.; ZHU, X. Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. **Biochim Biophys Acta.** v., 2009.
- SULLIVAN, P.F., NEALE, M.C.; KENDLER, K.S. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. **Am J Psychiatry.** v. 157, p. 1552-62, 2000.
- SURGET, A., SAXE, M., LEMAN, S., IBARGUEN-VARGAS, Y., CHALON, S., GRIEBEL, G., HEN, R.; BELZUNG, C. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. **Biol Psychiatry.** v. 64, p. 293-301, 2008.
- SUSLAK, L., SHOPSIN, B., SILBEY, E., MENDLEWICZ, J.; GERSHON, S. Genetics of affective disorders. I. Familial incidence study of bipolar, unipolar and schizo-affective illnesses. **Neuropsychobiology.** v. 2, p. 18-27, 1976.
- SUTCIGIL, L., OKTENLI, C., MUSABAK, U., BOZKURT, A., CANSEVER, A., UZUN, O., SANISOGLU, S.Y., YESILOVA, Z., OZMENLER, N., OZSAHIN, A.; SENGUL, A. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in major depression: effect of sertraline therapy. **Clin Dev Immunol.** v. 2007, p. 76396, 2007.
- SVENNINGSSON, P., TZAVARA, E.T., WITKIN, J.M., FIENBERG, A.A., NOMIKOS, G.G.; GREENGARD, P. Involvement of striatal and extrastriatal DARPP-32 in biochemical and behavioral effects of fluoxetine (Prozac). **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 99, p. 3182-7, 2002.
- TALER, M., GIL-AD, I., LOMNITSKI, L., KOROV, I., BAHARAV, E., BAR, M., ZOLOKOV, A.; WEIZMAN, A. Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) on human T lymphocyte function and gene expression. **Eur Neuropsychopharmacol.** v. 17, p. 774-80, 2007.
- THAKKER-VARIA, S., KROL, J.J., NETTLETON, J., BILIMORIA, P.M., BANGASSER, D.A., SHORS, T.J., BLACK, I.B.; ALDER, J. The neuropeptide VGF produces

- antidepressant-like behavioral effects and enhances proliferation in the hippocampus. **J Neurosci.** v. 27, p. 12156-67, 2007.
- THASE, M.E., CORYA, S.A., OSUNTOKUN, O., CASE, M., HENLEY, D.B., SANGER, T.M., WATSON, S.B.; DUBE, S. A randomized, double-blind comparison of olanzapine/fluoxetine combination, olanzapine, and fluoxetine in treatment-resistant major depressive disorder. **J Clin Psychiatry.** v. 68, p. 224-36, 2007.
- TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **Eur J Pharmacol.** v. 185, p. 1-10, 1990.
- TSANKOVA, N., RENTHAL, W., KUMAR, A.; NESTLER, E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci.** v. 8, p. 355-67, 2007.
- TSANKOVA, N.M., BERTON, O., RENTHAL, W., KUMAR, A., NEVE, R.L.; NESTLER, E.J. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nat Neurosci.** v. 9, p. 519-25, 2006.
- VALVASSORI, S.S., PETRONILHO, F.C., REUS, G.Z., STECKERT, A.V., OLIVEIRA, V.B., BOECK, C.R., KAPCZINSKI, F., DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Effect of N-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 32, p. 1064-8, 2008.
- VENCIO, R.Z., BRENTANI, H.; PEREIRA, C.A. Using credibility intervals instead of hypothesis tests in SAGE analysis. **Bioinformatics.** v. 19, p. 2461-4, 2003.
- VEUGER, S.J., HUNTER, J.E.; DURKACZ, B.W. Ionizing radiation-induced NF-kappaB activation requires PARP-1 function to confer radioresistance. **Oncogene.** v. 28, p. 832-42, 2009.
- VIDEBECH, P.; RAVNKILDE, B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. **Am J Psychiatry.** v. 161, p. 1957-66, 2004.
- VOLKE, V., WEGENER, G., BOURIN, M.; VASAR, E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. **Behav Brain Res.** v. 140, p. 141-7, 2003.
- WAERN, M., RUNESON, B.S., ALLEBECK, P., BESKOW, J., RUBENOWITZ, E., SKOOG, I.; WILHELMSSON, K. Mental disorder in elderly suicides: a case-control study. **Am J Psychiatry.** v. 159, p. 450-5, 2002.
- WANG, C.Y., MAYO, M.W., KORNELUK, R.G., GOEDDEL, D.V.; BALDWIN, A.S., JR. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. **Science.** v. 281, p. 1680-3, 1998.

- WANG, X., SU, B., ZHENG, L., PERRY, G., SMITH, M.A.; ZHU, X. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **J Neurochem.** v. 109 Suppl 1, p. 153-9, 2009.
- WARNER-SCHMIDT, J.L.; DUMAN, R.S. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. **Hippocampus.** v. 16, p. 239-49, 2006.
- WARNER-SCHMIDT, J.L.; DUMAN, R.S. VEGF as a potential target for therapeutic intervention in depression. **Curr Opin Pharmacol.** v. 8, p. 14-9, 2008.
- WEAVER, I.C. Epigenetic effects of glucocorticoids. **Semin Fetal Neonatal Med.** v. 14, p. 143-50, 2009.
- WEAVER, I.C., CERVONI, N., CHAMPAGNE, F.A., D'ALESSIO, A.C., SHARMA, S., SECKL, J.R., DYMOV, S., SZYF, M.; MEANEY, M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nat Neurosci.** v. 7, p. 847-54, 2004.
- WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. **Pharmacol Ther.** v. 45, p. 425-55, 1990.
- WITKIN, J.M., TZAVARA, E.T., DAVIS, R.J., LI, X.; NOMIKOS, G.G. A therapeutic role for cannabinoid CB1 receptor antagonists in major depressive disorders. **Trends Pharmacol Sci.** v. 26, p. 609-17, 2005.
- WONG, M.L., O'KIRWAN, F., HANNESTAD, J.P., IRIZARRY, K.J., ELASHOFF, D.; LICINIO, J. St John's wort and imipramine-induced gene expression profiles identify cellular functions relevant to antidepressant action and novel pharmacogenetic candidates for the phenotype of antidepressant treatment response. **Mol Psychiatry.** v. 9, p. 237-51, 2004.
- YILDIZ, F., ERDEN, B.F., ULAK, G., UTKAN, T.; GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology (Berl).** v. 149, p. 41-4, 2000.
- YU, C., RAHMANI, M., DENT, P.; GRANT, S. The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib. **Exp Cell Res.** v. 295, p. 555-66, 2004.
- ZAFRA, F., HENGERER, B., LEIBROCK, J., THOENEN, H.; LINDHOLM, D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. **Embo J.** v. 9, p. 3545-50, 1990.
- ZALSMAN, G., HUANG, Y.Y., OQUENDO, M.A., BURKE, A.K., HU, X.Z., BRENT, D.A., ELLIS, S.P., GOLDMAN, D.; MANN, J.J. Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. **Am J Psychiatry.** v. 163, p. 1588-93, 2006.

- ZARATE, C.A., JR., SINGH, J.B., CARLSON, P.J., BRUTSCHE, N.E., AMELI, R., LUCKENBAUGH, D.A., CHARNEY, D.S.; MANJI, H.K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch Gen Psychiatry**. v. 63, p. 856-64, 2006.
- ZHAO, C., TENG, E.M., SUMMERS, R.G., JR., MING, G.L.; GAGE, F.H. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **J Neurosci**. v. 26, p. 3-11, 2006.
- ZHOU, Q.G., HU, Y., HUA, Y., HU, M., LUO, C.X., HAN, X., ZHU, X.J., WANG, B., XU, J.S.; ZHU, D.Y. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **J Neurochem**. v. 103, p. 1843-54, 2007.
- ZOLADZ, P.R., PARK, C.R., MUNOZ, C., FLESHNER, M.; DIAMOND, D.M. Tianeptine: an antidepressant with memory-protective properties. **Curr Neuropharmacol**. v. 6, p. 311-21, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)