

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Julia Macedo Rosa

Efeito da creatina no comportamento tipo-depressivo induzido  
pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 em camundongos

Orientadora: Ana Lúcia Severo Rodrigues  
Co-orientador: Rui Daniel S. Prediger

Dissertação de mestrado  
apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre  
em Bioquímica.

Florianópolis  
2015



Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosa, Julia Macedo

Efeito da creatina no comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo beta-amiloide 1-40 em camundongos / Julia Macedo Rosa ; orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues ; coorientadora, Rui Daniel Schröder Prediger. - Florianópolis, SC, 2015. 98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Creatina. 3. peptídeo beta-amiloide 1-40. 4. tipo-antidepressivo. I. Severo Rodrigues, Ana Lúcia. II. Schröder Prediger, Rui Daniel. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.



Por

**Julia Macedo Rosa**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (15/PPGBQA/2015) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFSC, composta pelos doutores:



Prof(a). Dr(a). Carlos Pires Silva  
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



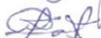
Dr(a) Ana Lucia Severo Rodrigues (BQA/CCB/UFSC)  
Orientador(a)



Dr(a) Ana Cristina Guerreiro de Souza (Pós-doutorado PPGFMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Carla Inês Tasca (BQA/CCB/UFSC)



Dr(a) Manuella Pinto Kaster (BQA/CCB/UFSC)

Florianópolis, 17 de Julho de 2015.



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha mãe pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Sempre com palavras doces e lanchinhos nas minhas madrugadas de estudos. Te amo muito, sem você eu não teria chegado até aqui. Dedico todas as minhas conquistas a você.

Também ao meu pai, por todo amor e palavras de apoio em todos os momentos. À minha família pelas palavras de incentivo e apoio. Amo vocês.

A Prof Ana Lúcia, muito obrigada pela orientação, paciência e dedicação nesses anos que estou no laboratório. Obrigada também pela confiança em aceitar o tema que eu escolhi para o meu projeto. E também por acreditar em mim e sempre me incentivar a fazer coisas.

Ao Prof Rui, muito obrigada pela co-orientação e por ter acreditado no meu projeto. E também pela oportunidade de iniciação científica quando eu estava no começo da graduação.

Queria agradecer a Luana que além de me ajudar em experimentos, também tenta cuidar da minha alimentação. Brigadinha nutri, prometo que vou tentar comer menos besteiras hehe

Queria agradecer muuuuito a esses meninos queridos do lab que me aturam desde a iniciação científica:

Ao Maurício pela paciência e dedicação desses anos, por me ensinar as técnicas do laboratório, por deixar eu fazer parte do CreatineTeam, enfim por contribuir com a minha formação e sempre mostrar o lado bom dessa vida de pesquisa. Serião.. muito obrigada por tudo!

Ao Francis (Fran) por me aturar nas minhas diversas fobias acadêmicas, por sempre ajudar nos protocolos e vir aos finais de semana contar um “tail pra noix”. Pelos almoços no RU e os lanchinhos na padaria e no Space. Pelas tentativas de fazer eu jogar volei e dançar forró para ter uma vida mais saudável. Obrigada por tudo kid!

Ao Colla pela parceria nos experimentos, pelas gordices na feirinha da UFSC. Por estar sempre alegre com esse sorriso no rosto que anima galera (hahahahaha). Brigada por estar sempre disposto a ajudar, até quando te chamo pra fazer experimento no final de semana. Valeu por tudo!!

Super valeu por me ajudarem na correção da dissertação em tempo record !!!!



Queria a agradecer a Prof Andreza e ao seu aluno Gianni por participarem do meu projeto, muito obrigada pela ajuda nos experimentos, pela dedicação e contribuição no meu trabalho.

Aos demais colegas do LANED e agregados: Vivian, Priscila, Camille, Ana Ramos, Manu, Pati, Vicente, Day (doc), Day (ic), Mauren, Fernanda, Pamylla, Amanda, muito obrigada!

Gostaria de fazer um agradecimento muito especial aos meus miguxos: Wolff, Vivis, Zã, Nath, Cindy, Felipe (Pato), Rorinho, Daniel, Beca e Bibo, Marília, Pâm, Bel e a todo o pessoal que de alguma forma participou dessa etapa da minha vida. Valeu por sempre inventarem alguma programação relax nos meus momentos de estresse.

Gostaria de agradecer a todos os professores pelos ensinamentos e paciência.

Agradecer também a UFSC pela estrutura fornecida e a CAPES pelo apoio financeiro.



*“É preciso correr muito para ficar no mesmo lugar. Se você quer chegar a outro lugar, corra duas vezes mais.”*

*Lewis Carroll*

*"E mesmo que tudo dê errado, mesmo assim, não tem problema. Eu deito no telhado de uma casa qualquer, olho pro céu e invento uma nuvem que chove sorrisos, bem em cima de mim."*

*Marcelo Camelo*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clivagem da proteína precursora amiloide (PPA) e formação da placa senil.-----	32
<b>Figura 2.</b> Relação entre os níveis de A $\beta$ e atividade sináptica -----	33
<b>Figura 3.</b> Potenciais mecanismos entre depressão e DA.-----	36
<b>Figura 4.</b> Envolvimento da GSK-3 $\beta$ na comorbidade depressão/DA.-----	38
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de defesa das enzimas antioxidantes.-----	39
<b>Figura 6.</b> Síntese de Creatina e o sistema Creatina/Fosfocreatina.-----	42
<b>Figura 7.</b> A creatina no Sistema Nervoso Central.-----	44
<b>Figura 8.</b> Sistema creatina/fosfocreatina e papel neuromodulador.-----	46
<b>Figura 9.</b> Esquema do protocolo experimental.-----	55
<b>Figura 10.</b> Teste de suspensão pela cauda-----	56
<b>Figura 11.</b> Teste do campo aberto.-----	57
<b>Figura 12.</b> Teste de borrifagem de sacarose.-----	58
<b>Figura 13.</b> Efeito do tratamento agudo com creatina (0,01 e 10 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no TSC (A) e no TCA (B), em um modelo de depressão induzido por peptídeo $\beta$ -amiloide 1-40.-----	66
<b>Figura 14.</b> Efeito do tratamento agudo com creatina (0,01 e 10 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no TBS. (A) Tempo de latência para o comportamento de autolimpeza e (B) tempo total de autolimpeza, em um modelo de depressão induzido por peptídeo $\beta$ -amiloide 1-40-----	68
<b>Figura 15.</b> Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) (Painel A) e de fluoxetina (10 mg/kg) (Painel B) sobre o imunoconteúdo hipocampal de p-GSK-3 no modelo de depressão induzido por peptídeo $\beta$ -amiloide 1-40.-----	70



**Figura 16.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) (Painel A) e de fluoxetina (10 mg/kg) (Painel B) sobre o imunoconteúdo hipocampal de GSK-3 $\beta$  (painéis A e B) no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.-----71

**Figura 17.** Imagem representativa do efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e de fluoxetina (10 mg/kg) sobre o imunoconteúdo hipocampal de GSK-3 $\beta$  e p-GSK-3 $\beta$  no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.-----72

**Figura 18.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) (Painel A) e de fluoxetina (10 mg/kg) (Painel B) sobre o imunoconteúdo hipocampal de HO-1 no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.-----73

**Figura 19.** Imagem representativa do efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e de fluoxetina (10 mg/kg) sobre o imunoconteúdo hipocampal de HO-1 no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.-----74

**Figura 20.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e de fluoxetina (10 mg/kg) sobre os níveis de GSH hipocampal no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.-----75

**Figura 21.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e de fluoxetina (10 mg/kg) sobre a atividade de GR (painel A) e TrxR (painel B) no hipocampo dos animais no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.-----76



## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: serotonina  
AGAT: L-arginina glicina amidinotransferase  
ANOVA: Análise de variância  
ARE: elemento de resposta antioxidante  
A $\beta$ 1-40:  $\beta$ -amiloide1-40  
BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo  
CAT: catalase  
Cr: creatina  
DA: Doença de Alzheimer  
DSM-V: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V  
GAA: ácido guanidino acetato  
GAMT: guanidino acetato metiltransferase  
GPx: glutaciona peroxidase  
GR: glutaciona redutase  
GSH: glutaciona  
GSK-3 $\beta$ : glicogênio sintase cinase 3 $\beta$   
GSSG: glutaciona oxidada  
HO-1: heme oxigenase-1  
HPA: hipófise-pituitária-adrenal  
i.c.v.: intracerebroventricular  
iMAO: inibidor da monoamina oxidase  
ISRN: Inibidor seletivo da recaptção de norepinefrina  
ISRS: Inibidor seletivo da recaptção de serotonina  
NA: noradrenalina  
NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
Nrf2: fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2  
p.o.: *per oral* (via oral)  
PCr: fosfocreatina  
PPA: proteína precursora amiloide  
SAMe: S-adenosilmetionina  
SNC: sistema nervoro central  
SOD: superóxido dismutase  
TBS: teste de borrifagem de sacarose  
TCA: teste do campo aberto  
Trx: tiorredoxina  
TrxR: tiorredoxina redutase  
TSC: teste de suspensão pela cauda



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> -----	23
<b>ABSTRACT</b> -----	<b>26</b>
<b>1.INTRODUÇÃO</b> -----	29
1.1 A DEPRESSÃO-----	31
1.2 A DOENÇA DE ALZHEIMER-----	34
1.3 COMORBIDADE DEPRESSÃO/DA-----	34
1.4 A VIA GKS-3 $\beta$ /NRF2/HO-1 NA COMORBIDADE DEPRESSÃO/DA-----	36
1.5 A CREATINA-----	41
1.6 O MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO PELO PEPTÍDEO $\beta$ -AMILOIDE 1-40-----	47
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> -----	49
<b>3 OBJETIVOS</b> -----	51
3.1 OBJETIVO GERAL-----	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	53
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> -----	53
4.1 ANIMAIS-----	53
4.2 FÁRMACOS E TRATAMENTO-----	53
4.3 TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA-----	55
4.4 TESTE DO CAMPO ABERTO-----	56
4.5 TESTE DE BORRIFAGEM DE SACAROSE-----	57
4.6 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT-----	58
4.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO-----	60
4.8 DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE GLUTATIONA-----	60
4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTIONA REDUTASE-----	60
4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIORREDOXINA REDUTASE-----	61
<b>5 ANALISE ESTATÍSTICA</b> -----	63
<b>6 RESULTADOS</b> -----	65
<b>7 DISCUSSÃO</b> -----	77
<b>8 CONCLUSÃO</b> -----	83
<b>9 PERSPECTIVAS</b> -----	84
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	<b>85</b>



## RESUMO

A depressão é a doença neuropsiquiátrica mais prevalente na doença de Alzheimer (DA), acometendo cerca de 50% dos indivíduos. A DA é a doença neurodegenerativa mais prevalente na população, que tem como característica neurodegeneração progressiva em áreas do lobo temporal e córtex cerebral, tendo como consequência mudanças comportamentais, déficits de memória e prejuízos cognitivos, que tendem a se agravar com a progressão da doença. A depressão esta relacionada, ao menos em parte, à diminuição nos níveis sinápticos de monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) ou ineficiência nos seus receptores. Assim, a maioria dos fármacos utilizados para o tratamento da depressão atua de maneira a restaurar a transmissão monoaminérgica, porém, a utilização destes fármacos acarreta no aparecimento de diversos efeitos adversos que podem diminuir a qualidade de vida dos pacientes e contribuir para a desistência do tratamento. Desta forma, existe a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Neste contexto, diversos estudos mostram que compostos que promovem à inibição da enzima glicogênio sintase cinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), como a creatina, apresentam efeito antidepressivo. A inibição desta cinase também apresenta efeitos positivos no tratamento da DA, reduzindo a formação de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares. O presente estudo investigou: a) o efeito da administração aguda de creatina sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (A $\beta$ -1-40) em camundongos, b) a participação da via GSK-3 $\beta$ /Nrf2/heme oxigenase (HO-1) no referido efeito. Para tanto, diferentes grupos experimentais foram submetidos a testes de avaliação de comportamento tipo-depressivo, como o teste de suspensão pela cauda (TSC) e o teste de borrifagem de sacarose (TBS), 10 dias após a administração de A $\beta$ -140. Posteriormente, a análises bioquímicas para mensuração de proteínas relacionadas com a via de sinalização proposta foram realizadas em homogenatos de hipocampo. O tratamento com A $\beta$ -1-40(400 pmol/animal, i.c.v.) apresentou efeito tipo-depressivo no TSC e no TBS. Os tratamentos agudos com creatina (10 mg/kg) e com fluoxetina (10 mg/kg) produziram efeito tipo-antidepressivo *per se* no TSC. Além disso, administração de creatina (0,01 e 10 mg/kg) e



fluoxetina (10 mg/kg) foi capaz de reverter o efeito tipo-depressivo induzido pelo A $\beta$ -1-40 no TSC e no TBS. Nenhum grupo experimental apresentou alteração na atividade locomotora no teste do campo aberto (TCA). Em relação às análises bioquímicas, a administração de A $\beta$ -1-40 (400 pmol/animal, i.c.v.) não causou alterações no imunocontéudo das proteínas fosfo-GSK-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$  e HO-1. O tratamento com creatina *per se*, na dose de 0,01 mg/kg foi capaz de aumentar a fosforilação de GSK-3 $\beta$  e o imunocontéudo de HO-1 no hipocampo. A fluoxetina *per se* aumentou a fosforilação de GSK-3 $\beta$ , mas não afetou os níveis de HO-1. Além disso, o tratamento com A $\beta$ -1-40 aumentou os níveis de GSH e a atividade das enzimas GR e TrxR no hipocampo quando comparado aos animais que receberam veículo. Contudo, o aumento dos níveis de GSH e na atividade da enzima TrxR não foi observado nos tratados com A $\beta$ -1-40 que posteriormente uma única dose de creatina ou fluoxetina. A atividade da enzima TrxT se apresentou aumentada nos animais do grupo A $\beta$ -1-40 tratados com creatina na dose de 0,01 mg/kg. Os resultados deste trabalho sugerem que a creatina pode ser uma boa estratégia para o tratamento da comorbidade depressão/DA. Contudo, o envolvimento da via GSK-3 $\beta$ /Nrf2/ HO-1 no efeito da creatina ainda precisa ser melhor investigado.

Palavras-chave: Creatina, peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40, tipo-antidepressivo



## ABSTRACT

Depression is the most prevalent neuropsychiatric comorbidity found in patients with Alzheimer disease (AD), affecting about 50% of the affected individuals. AD is the most prevalent neurodegenerative disease, and it is characterized by progressive neurodegeneration especially in areas such as the cerebral cortex and temporal lobe, resulting in behavioral changes, memory loss and cognitive deficits. These symptoms tend to worsen with disease progression. Most drugs used for the treatment of depression act restoring the monoaminergic transmission. Although the current antidepressant therapy usually alleviates depressive symptoms, the delay onset of the therapeutic effects, the high prevalence of refractory responses and the number of adverse effects exhibited by a large number of patients are major drawbacks of the current therapy. Thus, there is a need to develop new therapies acting on different cellular targets and capable to exhibit a with faster antidepressant response. In this context, several studies have shown that compounds that promote inhibition of the enzyme glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), as creatine, have antidepressant effect. Inhibition of this kinase also has positive effects in the treatment of AD, reducing the formation of amyloid plaques and neurofibrillary tangles. This study investigated the effect of acute administration of creatine or fluoxetine on depressive-like behavior and anhedonic/motivational ten days after the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of  $\beta$ -amyloid peptide 1-40 (A $\beta$ 1-40) in mice. In addition, we evaluated the participation of GSK-3 $\beta$ /Nrf2/heme oxygenase 1 (HO-1) pathway in the behavioral and biochemical effects elicited by creatine in this model. Therefore, different experimental groups were subjected to depressant-like behavior assessment tests, such as the tail suspension test (TST) and splash test (ST) and biochemical analyzes performed in order to measure the hippocampal levels of proteins related to GSK-3 $\beta$  / Nrf2 / HO pathway. The results showed that: a) Treatment with A $\beta$ 1-40 (400 pmol/mice, i.c.v.) had depressant-like effect on TST and reduced anhedonic/motivational response in the SP, ten days after its administration; b) The acute treatment with creatine (10 mg/kg, p.o.) and fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) in the tenth day after vehicle



administration had antidepressant-like effects *per se* in the TST, but not in SP; c) Ten days after A $\beta$ 1-40 administration increased immunocent of GSH, GR and TrxR was found in the hippocampus of mice d) ) No changes were found in the locomotor activity in any of the groups in the open field test; e) A $\beta$ 1-40 treatment did not alter the GSK-3 $\beta$  and HO-1 immunocent or phosphorylation GSK-3 $\beta$  f) Treatment with creatine (0.01 mg/kg) increased the GSK-3 $\beta$  phosphorylation and HO-1 immunocent; g) Treatment with fluoxetine *per se* increased the GSK-3 $\beta$  phosphorylation, but did not affect HO-1 immunocent h) Treatment with A $\beta$ 1-40 increased GSH levels and the activity of the enzymes TrxR and GR in the hippocampus, but these effects were not prevented by creatine or fluoxetine, except the TrxR activity, that increased in A $\beta$ 1-40 group treated with creatine (0.01 mg/kg) ). The present data suggests that creatine, might represent a good strategy to manage the depressive and anhedonic symptoms in patients with depression/DA. The involvement of GSK-3 $\beta$ /Nrf2/HO-1 pathway in these conditions needs to be further elucidated.

Keywords: creatine,  $\beta$ -amyloid peptide 1-40, antidepressant-like.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A DEPRESSÃO

A depressão é um transtorno de humor crônico e recorrente, que acarreta em considerável perda de produtividade, qualidade de vida e déficits no relacionamento social (ASSOCIATION, 2013). Esta doença é considerada uma das condições neuropsiquiátricas mais comuns. De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde a depressão será a primeira causa de incapacitação em adultos até o ano de 2030 (MURRAY e LOPEZ, 1997; SKOLNICK, POPIK e TRULLAS, 2009). A depressão é uma doença multifatorial cuja etiologia ainda não está completamente elucidada. Com base nesse aspecto multifatorial, é importante destacar a associação entre fatores genéticos e ambientais, principalmente na infância desses indivíduos e suas implicações na idade adulta. (BERTON e NESTLER, 2006).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V (DSM-V), a depressão também conhecida como depressão maior ou unipolar, é caracterizada por episódios depressivos recorrentes (DSM-V, 2013). Os critérios para diagnóstico da depressão são baseados em sintomas estabelecidos pelo DSM-V, dentre eles: humor deprimido na maior parte do tempo, diminuição marcante no interesse ou prazerem todas ou quase todas as atividades (anedonia), aumento ou diminuição do peso, insônia ou hipersônia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou falta de energia, sentimentos de culpa ou desvalia excessivos, diminuição na capacidade de concentração e pensamentos recorrentes de morte ou ideação suicida. Para o paciente ser diagnosticado com depressão é necessário apresentar no mínimo cinco sintomas entre esses nove citados, e é exigida a presença de pelo menos um dos dois primeiros sintomas mencionados (humor deprimido ou anedonia) presentes na maior parte do tempo com duração mínima de duas semanas (ASSOCIATION, 2013).

O tratamento para a depressão é feito com fármacos que, na sua maioria, agem na modulação dos sistemas monoaminérgicos, devido a uma hipofunção destes sistemas estar associada a doença (HASHIMOTO, 2011). Os antidepressivos podem ser classificados em diferentes classes, tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase (iMAO), inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e de noradrenalina (ISRN) ou inibidores de recaptção dual (serotonina/noradrenalina), além de antidepressivos atípicos

(MORILAK e FRAZER, 2004). Porém, esses fármacos apresentam efeitos colaterais como dor de cabeça, ganho de peso, disfunção sexual, arritmia, dentre outros, além disso, o tratamento com esses fármacos proporciona uma remissão completa dos sintomas para apenas cerca de 50% dos pacientes. (BERTON e NESTLER, 2006).

Embora diversas hipóteses expliquem os mecanismos neurobiológicos da depressão, sabe-se que esta doença resulta da disfunção de vários neurotransmissores ou seus metabolitos. A hipótese monoaminérgica da depressão sugere que esta seja resultante da diminuição de serotonina (5-HT) e/ou, noradrenalina (NA) ou mesmo na ineficiência dos receptores para estes neurotransmissores (MANN *et al.*, 1996; WONG e LICINIO, 2001). Além da participação destes sistemas de neurotransmissores, estudos pré-clínicos e clínicos indicam que o sistema dopaminérgico também está envolvido na regulação do humor e na depressão. Deste modo, os tratamentos para depressão envolvem o aumento da biodisponibilidade de monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) na fenda sináptica (HASHIMOTO, 2011). Embora os fármacos utilizados atualmente para o tratamento da depressão aumentem agudamente os níveis de monoaminas na fenda sináptica, os mesmos proporcionam uma resposta terapêutica tardia, sendo necessárias de 3 a 5 semanas para o início dos efeitos terapêuticos. A demora na eficácia clínica desses fármacos associado aos efeitos adversos pronunciados comprometem o tratamento do paciente, implicando na descontinuidade dessa intervenção farmacológica em grande parte dos pacientes (BEASLEY *et al.*, 1991; MONTGOMERY *et al.*, 1994). A fim de diminuir essa limitação, muitos estudos estão voltados para pesquisa e desenvolvimento de agentes farmacológicos mais eficazes e com menos efeitos adversos (SANACORA, TRECCANI e POPOLI, 2012).

Tendo como base o mecanismo de ação e a demora na resposta clínica dos antidepressivos monoaminérgicos atualmente utilizados, teorias recentes sugerem que além da deficiência de monoaminas, outros fatores estão envolvidos na fisiopatologia da depressão (RUHE, MASON e SCHENE, 2007). O efeito terapêutico desses fármacos também está relacionado a adaptações decorrentes das vias de sinalização ativadas pelas monoaminas, que culmina em neuroplasticidade, neurogênese e neuroproteção (DUMAN, HENINGER e NESTLER, 1997; NESTLER *et al.*, 2002).

Estudos mostram que a deficiência de fatores neurotróficos, conhecida como hipótese neurotrófica, possui papel fundamental para o

desenvolvimento da depressão. O uso de antidepressivos reverte essa deficiência, sendo essencial na remissão dos sintomas (NESTLER *et al.*, 2002; DUMAN e MONTEGGIA, 2006). Um exemplo de fator neurotrófico envolvido na depressão é o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que está envolvido em processos de sobrevivência celular, neurogênese e plasticidade neural. Um estudo já demonstrou que o BDNF reverteu à atrofia observada no córtex cerebral e hipocampo de pacientes com depressão (CASTREN, 2004), estudos pré-clínicos também demonstram que a depressão está associada à diminuição dos níveis de BDNF principalmente no hipocampo e no córtex pré-frontal (NIBUYA, MORINOBU e DUMAN, 1995)

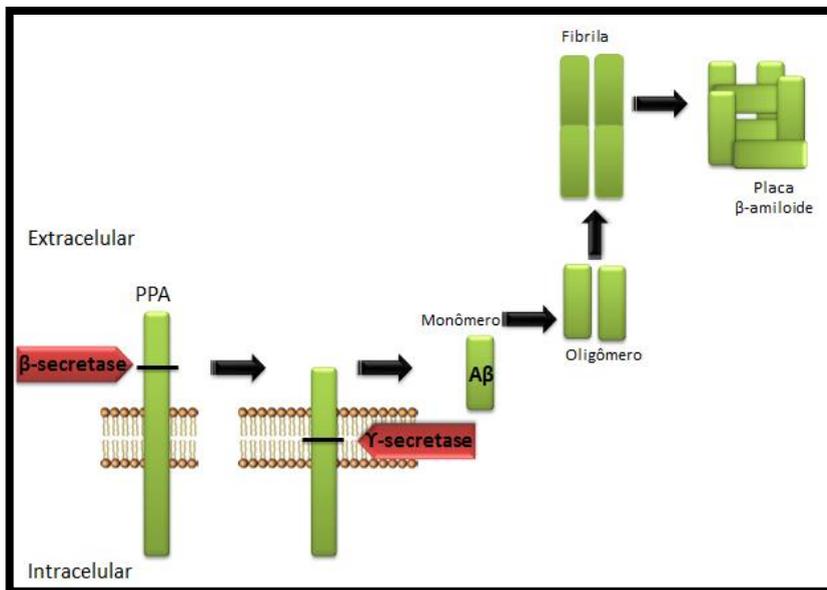
## 1.2 A DOENÇA DE ALZHEIMER (DA)

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa responsável por cerca de 70% dos casos de demência na população (GLENNER E WONG, 1984). A DA está diretamente relacionada com a idade, de maneira que o aumento da expectativa de vida da população reflete diretamente no aumento de sua ocorrência (NAGLIE *et al.*, 2011). Essa doença é caracterizada por uma degeneração progressiva de regiões específicas do sistema nervoso central (SNC), incluindo córtex cerebral, estriado e hipocampo, tendo como consequência mudanças comportamentais, déficits de memória e prejuízos cognitivos, que tendem a se agravar com a progressão da doença (GLENNER E WONG, 1984).

Uma das hipóteses que explica a etiologia da DA é a hipótese da cascata amiloide, a qual postula que a clivagem proteolítica da proteína precursora amiloide (PPA) pelas enzimas  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase resulta numa maior produção dos peptídeos  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42) que podem se agregar formando as placas senis (HARDY e SELKOE, 2002). A formação dessas placas ocorre devido ao acúmulo no espaço extracelular do peptídeo  $\beta$ -amiloide, seja por aumento da sua produção ou diminuição da sua degradação ou redução de sua depuração pela barreira hematoencefálica. Como mostrado na **Figura 1** os peptídeos A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42 podem também se organizar em oligômeros de diversas dimensões, sendo que estes afetam processos de neuroplasticidade (como a potenciação de longo prazo – LTP), bloqueando os mecanismos de formação de novas memórias (MAWUENYEGA *et al.*, 2010). Em uma situação fisiológica a PPA é clivada pela enzima  $\alpha$ -secretase e na sequência pela  $\gamma$ -secretase, desta forma os monômeros de A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42 não são formados por esta

via. Contudo, A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42 são formados em situação fisiológicas, e apresentam um papel importante na atividade sináptica, porém quando ocorre um acúmulo desses peptídeos a transmissão sináptica é prejudicada (**Figura 2**). Outra característica da DA são os emaranhados neurofibrilares presentes no espaço intracelular, que são formados pelo acúmulo de proteínas TAU hiperfosforilada associadas aos microtúbulos. Esses emaranhados podem ser resultado do excesso de peptídeo  $\beta$ -amiloide, da mobilização da micróglia, liberação de citocinas pró-inflamatórias, desregulação do cálcio neuronal e hiperativação de cinases como a glicogênio sintase cinase -3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Quando ocorre a hiperfosforilação da proteína TAU, ela se dissocia dos microtúbulos e se agrega sob a forma de filamentos helicoidais pareados insolúveis (PALOP e MUCKE, 2010; SAKONO e ZAKO, 2010).

**Figura 1.** Clivagem da proteína precursora amiloide (PPA) e formação da placa senil.

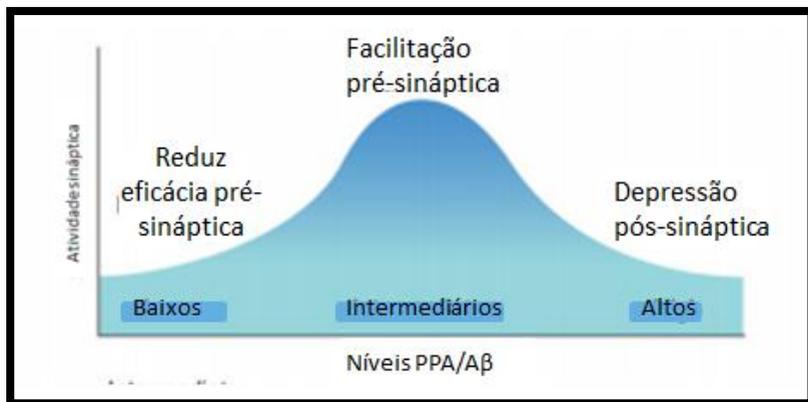


**Legenda:** a PPA é clivada primeiramente pela enzima  $\beta$ -secretase, e em seguida pela  $\gamma$ -secretase e assim, o peptídeo  $\beta$ -amiloide é formado (A $\beta$ 1-40 e/ou A $\beta$ 1-42). Ele pode então se agregar a outros fragmentos

de peptídeos  $\beta$ -amiloide e formar oligômeros, fibrilas e por fim a placa  $\beta$ -amiloide. PPA, proteína precursora amiloide.

**Fonte:** do autor.

**Figura 2.** Relação entre os níveis de A $\beta$  e atividade sináptica



**Legenda:** Níveis intermediários de A $\beta$  aumentam a atividade pré-sináptica, enquanto níveis elevados ou baixos de A $\beta$  prejudicam a atividade sináptica através da indução de depressão pós-sináptica ou redução da eficácia pré-sináptica.

**Fonte:** Adaptado de PALOP e MUCKE, 2010.

Outra hipótese que tenta elucidar etiologia da DA, é a hipótese colinérgica que postula que a deficiência de acetilcolina na DA é devido a atrofia do *nucleus basalis de Meynert*, o qual é a fonte produtora da enzima colina acetiltransferase. Essa enzima é transportada para estruturas no sistema nervoso central como hipocampo, córtex cerebral, amígdala, entre outros. Nessas estruturas ela catalisa a reação de síntese da acetilcolina a partir da colina e da acetilcoenzima A. Após ser formada a acetilcolina é liberada na fenda sináptica e então interage com seus receptores muscarínicos e nicotínicos. A acetilcolina restante na fenda sináptica é degradada pela enzima acetilcolinesterase em colina e acetato (BARTUS e EMERICH, 1999; AULD *et al.*, 2002).

Com a atrofia do *nucleus basalis*, há uma diminuição da síntese de colina acetilcolina e como consequência, uma diminuição da produção de acetilcolina. Assim, a estratégia atual adotada para o tratamento da DA consiste em fármacos que tem como objetivo

umentar a disponibilidade da acetilcolina., Os inibidores da acetilcolinesterase, tratam os sintomas da doença, porém não impedem a neurodegeneração (GROSSBERG, 2003). Outra estratégia utilizada para o tratamento da DA é a memantina, um fármaco antagonista não competitivo de receptores de glutamato do subtipo NMDA. Por ter afinidade moderada com os receptores NMDA, a memantina promove neuroproteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica presente na DA, além de permitir a neurotransmissão e os mecanismos de neuroplasticidade neuronais associados à ativação destes receptores (PARSONS *et al.*, 1993). Este fármaco pode ser utilizado sozinho ou em conjunto com inibidores da acetilcolinesterase (TARIOT *et al.*, 2004). Um estudo com pacientes com DA moderada a grave que foram tratados com o inibidore da acetilcolinesterase, donepezil associado à memantina, mostrou ser benéfico em relação a cognição (WENK *et al.*, 2000).

### 1.3 COMORBIDADE DEPRESSÃO/DA

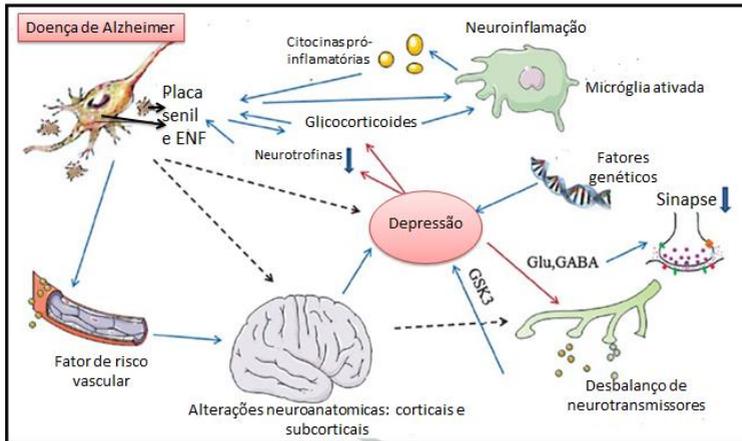
A depressão é a doença neuropsiquiátrica mais prevalente em pacientes com DA, acometendo cerca de 50% dos indivíduos afetados. (ENGEDAL *et al.*, 2011). O diagnóstico de depressão nesses indivíduos é complexo, pois pacientes com DA não apresentam toda a sintomatologia clássica da depressão como tristeza, insônia e perda de apetite, porém um sintoma clássico, a anedonia, é bem evidente nesses pacientes (OLIN *et al.*, 2002). Desta forma o diagnóstico de depressão nesses pacientes ainda não é feito de forma totalmente adequada (CHI *et al.*, 2014). Os fármacos disponíveis para o tratamento da depressão associada à DA são os mesmos citados para tratar depressão. Os efeitos adversos então são somados aos dos fármacos utilizados para o tratamento da DA, e como consequência ocorre a redução da qualidade de vida do paciente acometido com esta comorbidade (KIM, KIM e KONG, 2013).

A literatura relata que a depressão pode ser um fator de risco ou uma condição que predispõe à DA e estas proposições ainda não estão totalmente elucidadas (CHI *et al.*, 2014). Estudos consideram que quando a depressão tem início proximal ao diagnóstico da DA pode ser considerado um sintoma pré-clínico da manifestação da DA (HESER *et al.*, 2013). A depressão pode ser considerada um fator de risco para DA devido a fatores associados a este transtorno tais como, as alterações

neuroanatomicas presentes na depressão idiopática, como a atrofia do córtex pré-frontal e hipocampo, também são observadas em pacientes com DA. A disfunção do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) também está presente nas duas patologias. Um estudo mostrou que pacientes com depressão e DA tem um aumento nos níveis de glicocorticóides no plasma e no fluido cerebrospinal (POPP *et al.*, 2009). Porém a hipercoisolemia presente em pacientes com DA difere dos pacientes com depressão maior, pois na DA esse aumento de glicocorticóides não ocorre de forma crônica (NOTARIANNI, 2013). Outra característica comum nas duas doenças é a neuroinflamação, aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (ROJO *et al.*, 2008). Além disso, níveis baixos de BDNF e do seu RNA mensageiro estão presentes em pacientes com depressão e com DA (NAGAHARA *et al.*, 2009). Os mecanismos presentes nessas duas doenças ainda não estão elucidados, porém esses fatores citados podem ser alvos para futuras terapias para o tratamento da depressão na DA (CHI *et al.*, 2014).

Fatores de riscos vasculares como hipertensão, diabetes, dislipidemia, doença cardiovascular e acidente vascular cerebral estão associados com depressão em idade avançada e com diagnóstico e o progresso da DA (VALKANNOVA e EBMEIER, 2013). Sabe-se que muitos pacientes com DA e depressão apresentaram algum tipo de doenças vascular, nessas doenças estão presentes fatores como aumento da inflamação e estresse oxidativo que podem estar relacionados com depressão e DA (CHI *et al.*, 2014) (**Figura 3**).

**figura 3.** Potenciais mecanismos entre depressão e DA.



**Legenda:** Fatores genéticos, o desequilíbrio entre neurotransmissores, alterações neuroanatomicas e fatores de risco vascular estão associados com a depressão na DA. A deposição de peptídeo  $\beta$ -amiloide pode danificar a barreira hematoencefálica e causar alterações que podem levar a mudanças neuroanatomicas (atrofia do hipocampo e córtex) e desequilíbrio de neurotransmissores em regiões específicas do cérebro. A depressão agrava a disfunção do eixo HPA, gera um quadro de inflamação crônica e déficits de neurotrofinas. Os níveis de glicocorticóides estão aumentados, e os níveis de BDNF estão reduzidos. GABA; ácido gama aminobutírico, Glu, glutamato, GSK3 $\beta$ , glicogênio sintase 3; ENF, emaranhados neurofibrilares.

**Fonte:** adaptado de CHI *et al.*, 2014.

#### 1.4 A VIA GSK-3 $\beta$ /Nrf-2/HO-1 NA COMORBIDADE DEPRESSÃO/DA

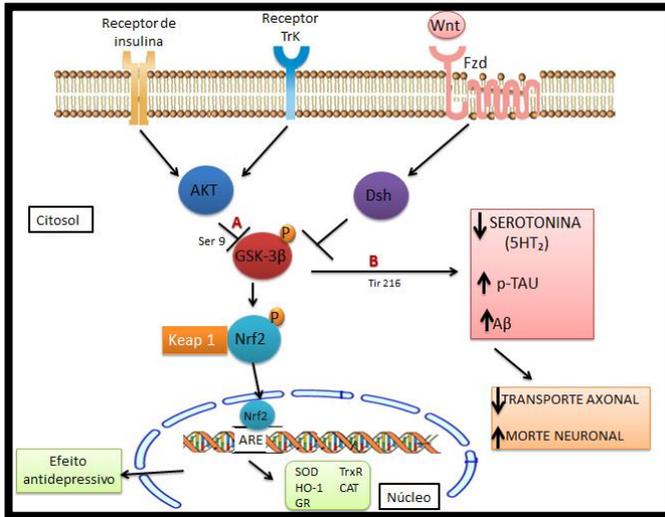
A GSK-3 $\beta$  tem diversos sítios de fosforilação, quando é fosforilada no resíduo de tirosina 216, esta cinase se torna ativa e impede a translocação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), assim ele continua ligado à proteína Keap 1 e posteriormente é degradado por ubiquitinação no citosol. Porém quando GSK-3 $\beta$  é fosforilada no resíduo de serina 9 e conseqüentemente inibida, ocorre um aumento da atividade transcricional de Nrf-2. Este, quando fosforilado em serina 40 se dissocia da proteína Keap 1 e é translocado

para o núcleo onde se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE), e promove a transcrição de enzimas antioxidantes, como a hemoxygenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase, glutathione reductase (GR), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), tiorredoxina reductase (TrxR) entre outras proteínas (**Figura 4**) (KATSUOKA *et al.*, 2005; KENSLER, WAKABAYASHI e BISWAL, 2007; BRIGELIUS-FLOHE e MAIORINO, 2013). A HO-1 é responsável por converter o grupamento heme livre em quantidades equimolares de  $Fe^{2+}$ , monóxido de carbono e biliverdina, o que resulta em efeito antioxidante e antiapoptótico, o qual pode desempenhar um papel importante na proteção contra a morte celular que ocorre tanto na depressão quanto na DA. O grupamento heme está presente nas hemácias, mioglobina e enzimas como CAT, citocromo P450 e peroxidases, (GOZZELINO, JENEY e SOARES, 2010).

A SOD é uma enzima que exerce um papel fundamental na defesa do organismo por atuar na remoção do radical superóxido, através de uma reação de dismutação, em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (WEISIGER e FRIDOVICH, 1973). A glutathione (GSH) tem um papel antioxidante muito importante no equilíbrio do controle redox, ela age metabolizando o peróxido de hidrogênio, onde primeiro o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) sob a ação da SOD é convertido em  $H_2O_2$ , o qual é reduzido à água pela ação do sistema antioxidante dependente da GSH e glutathione peroxidase (GPx). A glutathione oxidada (GSSG) é convertida novamente em glutathione pela GR, voltando a ter atividade antioxidante. (BRIGELIUS-FLOHE e MAIORINO, 2013) (**Figura 5**).

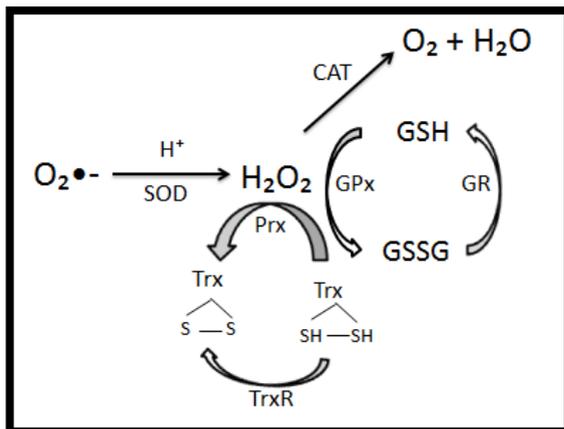
A TrxR pertence ao sistema tiorredoxina, que é composto por fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e tiorredoxina. Este sistema está envolvido na redução de ligações específicas de dissulfetos que desempenham diversas funções biológicas, como síntese de DNA, defesa contra o estresse oxidativo, apoptose e sinalização redox, agindo como uma doadora de elétrons do hidrogênio para inúmeras enzimas antioxidantes intra e extracelulares. O sítio ativo da tiorredoxina contém dois resíduos de cisteína, onde ocorre uma reação de oxidação reversível para formar uma ligação dissulfeto. Em seguida a tiorredoxina reductase recicla a tiorredoxina em um estado reduzido utilizando o NADPH como doador de elétrons (HOLMGREN, 1985; HOLMGREN e BJORNSTEDT, 1995) (**Figura 5**).

**Figura 4.** Envolvimento da GSK-3 $\beta$  na comorbidade depressão/DA.



**Legenda:** A) Quando a glicogênio sintase cinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) está fosforilada no resíduo de serina 9, ela fica inativa, ocorrendo a translocação de Nrf2 para o núcleo, que liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE), e promove a codificação de enzimas antioxidantes, como a hemeoxigenase-1 (HO-1), glutatona redutase (GR), tioredoxina redutase (TrxR), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), entre outras proteínas responsivas ao estresse. B) Por outro lado quando a GSK-3 $\beta$  está fosforilada no resíduo de tirosina 216 ocorre um aumento da fosforilação da proteína TAU e como consequência um aumento da formação dos emaranhados neurofibrilares. A ativação de GSK-3 $\beta$  também implica em uma maior clivagem da PPA pela enzima  $\beta$ -secretatase e um aumento na formação de peptídeo  $\beta$ -amiloide, e uma diminuição na produção de serotonina, devido a maior atividade de 5HT<sub>2</sub>. Como consequência ocorre uma diminuição do transporte axonal e aumento da morte neuronal. **Fonte:** do autor.

**Figura 5.** Mecanismo de defesa das enzimas antioxidantes.



**Legenda:** A enzima superóxido dismutase transforma o radical  $O_2^{\bullet-}$  em peróxido de hidrogênio. O  $H_2O_2$  é convertido em água pela GPx à custa de glutatona reduzida que se torna oxidada. A glutatona oxidada (GSSG) é novamente reduzida pela GR à custa de NADPH. Sistema relacionado à Trx, quando os grupos tióis de proteínas, como a peroxidirredoxina são oxidados por EROs, a proteína Trx reage reduzindo esses grupos tióis, tornando a proteína novamente ativa; a tiorredoxina agora oxidada é reduzida pela enzima TrxR, que recebe elétrons do NADPH, recuperando a atividade protetora da Trx. **Abreviações:** CAT, catalase; GPx, glutatona peroxidase; GR, glutatona redutase; GSH, glutatona; GSSG, glutatona oxidada; Trx, tiorredoxina; TrxR, tiorredoxina redutase; SOD, superóxido dismutase; Prx, peroxidirredoxina.

**Fonte:** do autor.

Estudos em camundongos demonstram um aumento da atividade da GSK-3 $\beta$  após a indução do comportamento tipo-depressivo associado a um trauma cerebral leve (SHAPIRA *et al.*, 2007). Também a atividade serotoninérgica é regulada pela fosforilação e desfosforilação da GSK-3 $\beta$ . Um estudo com camundongos transgênicos nos quais havia uma redução da produção de serotonina, mostrou que estes animais apresentavam um aumento significativo da atividade de GSK-3 $\beta$ , além de comportamento tipo-depressivo (BEAULIEU *et al.*, 2008). A fosforilação de GSK-3 $\beta$  é aumentada pela ativação de receptores 5HT $_{1a}$ ,

diminuindo assim sua atividade, por outro lado a ativação de receptores 5HT<sub>2</sub> leva a um aumento da atividade da GSK-3 $\beta$  (LI *et al.*, 2004). Portanto, alterações nos sistemas serotoninérgicos podem determinar aumento da atividade da GSK-3 $\beta$ , sendo um fator importante na fisiopatologia da depressão (JOPE e ROH, 2006).

A GSK-3 $\beta$  ativada é uma característica da DA por hiperfosforilar a proteína TAU, também por ser ativada por um domínio intracelular da proteína precursora amiloide (GHOSAL *et al.*, 2009). Nesse contexto, compostos que inibem a GSK-3 $\beta$  constituem um importante alvo terapêutico para o tratamento da DA, pois impedem a hiperfosforilação da proteína TAU e acarretam na diminuição da clivagem da PPA (PHIEL *et al.*, 2003). Como consequência da GSK-3 $\beta$  ativa o controle do estresse oxidativo é afetado, pois ocorre uma diminuição da transcrição dos fatores antioxidantes. Essa situação é comum em condições presentes no envelhecimento e doenças crônicas desencadeando alterações no controle das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em das defesas moleculares antioxidantes que se tornam ineficientes para a homeostase. Assim, o estresse oxidativo começa a danificar uma série de macromoléculas, tanto no citosol, no núcleo e nas mitocôndrias. Este dano ocorre ao longo da vida e conduz a uma série de cascatas que pode culminar em morte neuronal por apoptose e/ou necrose (RODRIGUES, PETERSEN e PERRY, 2014).

O encéfalo é particularmente propenso a danos ocasionados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sabe-se que o encéfalo é altamente rico em ácidos graxos poliinsaturados e pobre em defesas antioxidantes. Além disso, este órgão requer alto consumo de oxigênio e existe uma quantidade considerável de metais redox-ativos, como cobre e ferro (VALKO *et al.*, 2007; MANGIALASCHE *et al.*, 2009). É importante ressaltar que áreas envolvidas na fisiopatologia da depressão e da DA, como hipocampo e córtex pré-frontal são afetados por esse desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e defesas antioxidantes, isso parece desempenhar um papel importante na patogênese da depressão e da DA (FRODL *et al.*, 2002; SAVITZ e DREVETS, 2009; RODRIGUES, PETERSEN e PERRY, 2014).

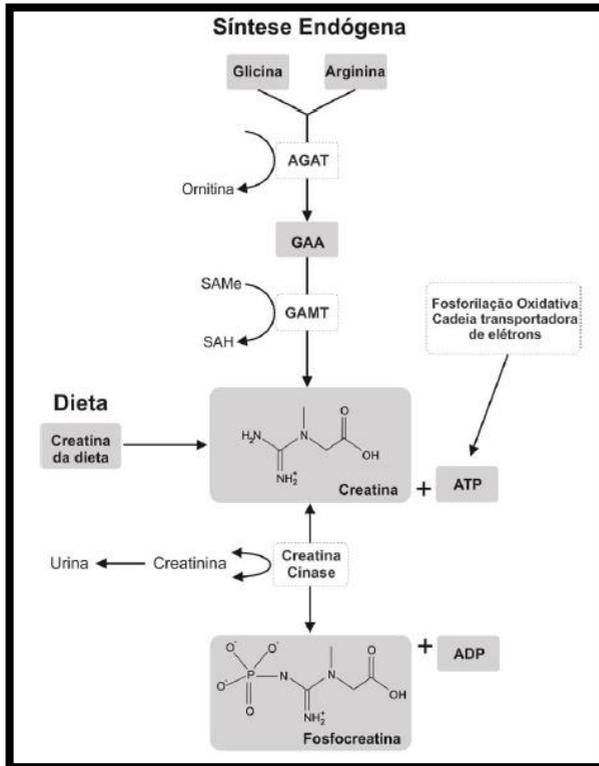
Assim o estresse oxidativo pode ser considerado um marcador neurobiológico importante presente na depressão e na DA. O estresse oxidativo pode ser induzido pelo peptídeo A $\beta$ , o mesmo é capaz de aumentar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por interagir com os complexos da cadeia respiratória na mitocôndria, consequentemente ocorre uma disfunção do processo de respiração celular e um aumento

das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Como resultado, peptídeo A $\beta$  pode induzir então a disfunção sináptica, cascatas de apoptose, hiperfosforilação da proteína TAU, gerando uma redução da capacidade cognitiva (MATTSON, 2004; LAFERLA, GREEN e ODDO, 2007). Estudos já demonstraram que a injeção intracerebroventricular de peptídeo A $\beta$  induz estresse oxidativo em roedores (PREDIGER *et al.*, 2007). A relação do estresse oxidativo como causa ou consequência da DA ainda é inconclusiva, porém estudos mostram que o estresse oxidativo recorrente do envelhecimento ou da disfunção mitocondrial, poderiam ser o gatilho inicial da amiloidogênese. Ainda, é fato que respostas oxidativas estão presentes tanto estágio inicial quanto no final da DA, sendo então importante alvo terapêutico na DA (FRANK-CANNON *et al.*, 2009; VERRI *et al.*, 2012).

## 1.5 A CREATINA

A creatina (Cr) é um composto tipo-guanidina, sintetizado endogenamente nos rins, pâncreas, testículo e também no encéfalo. Essa síntese acontece a partir de aminoácidos glicina, arginina e metionina, através da reação das enzimas L-arginina glicina amidinotransferase (AGAT) e guanidino acetato metiltransferase (GAMT) (**Figura 6**) (BRAISSANT *et al.*, 2001; PERSKY E BRAZEAU, 2001). Endogenamente o organismo sintetiza cerca de 1 a 2 gramas por dia e o restante é proveniente da dieta, principalmente por meio do consumo da carne vermelha e peixes (WYSS E KADDURAH-DAOUK, 2000). Independente de sua origem (endógena ou exógena), a creatina é transferida aos vasos sanguíneos por difusão, sendo distribuída para os tecidos nos quais é captada por meio de transportadores específicos dependentes de sódio e cloreto (MAK *et al.*, 2009). Estes transportadores são encontrados nos rins, coração, músculo liso, fígado, encéfalo e na barreira hematoencefálica (BRAISSANT *et al.*, 2001; PERSKY E BRAZEAU, 2001). Além disso, evidências mostram uma possível síntese de creatina no encéfalo, devido à expressão das enzimas AGAT e GAMT nos neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. Porém, apenas 12% dessas células expressam as duas enzimas, enquanto 30% expressam apenas uma, sugerindo que cada célula participa da síntese de creatina em etapas diferentes (BRAISSANT E HENRY, 2008).

**Figura 6.** Síntese de Creatina e o sistema Creatina/Fosfocreatina.



**Legenda:** A glicina e arginina sofrem uma reação catalisada pela enzima L-arginina glicina amidinotransferase (AGAT) produzindo ornitina e ácido guanidino acetato (GAA). Na sequência catalisada pela enzima guanidino acetato metil-transferase (GAMT), um grupo metil do composto S-adenosilmetionina (SAME) é transferido para o ácido guanidinoacetato (GAA), formando a Creatina. A Creatina sofre interconversão a Fosfocreatina pela enzima Creatina Cinase mitocondrial, liberando creatinina como metabólito que é excretado pela urina.

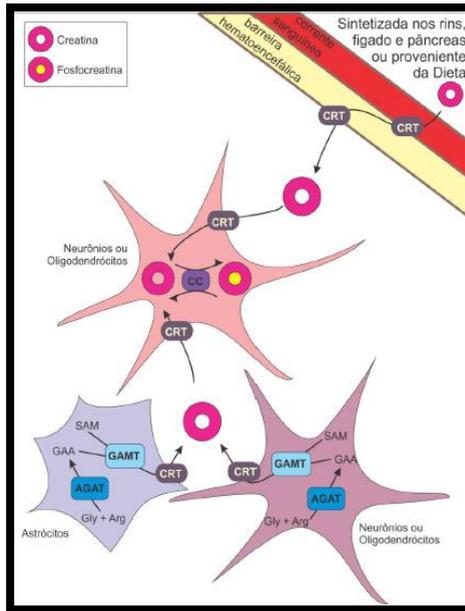
SAH: S-adenosilhomocisteína.

**Fonte:** figura cedida por Agatha Olivera

Depois de sintetizada, em tecidos alvos a creatina pode ser fosforilada na mitocôndria pela enzima creatina cinase mitocondrial,

sendo convertida em fosfocreatina com gasto de um ATP por molécula de fosfocreatina produzida. No citosol este composto de alto poder energético pode ser reconvertido em creatina pela creatina cinase citosólica, liberando uma molécula de ATP, sendo que a creatina formada é novamente transportada para o espaço intermembranoso mitocondrial ou quando no SNC, pode ser armazenada em vesículas com outros neurotransmissores. Assim, a creatina contribui para que não ocorra grandes oscilações nos níveis de ATP e ADP que poderiam ocorrer nesses tecidos. Por esse motivo, funções cerebrais que necessitam de energia, como transporte de sódio e cálcio, sinalização intracelular e transporte axonal e dendrítico, acionam o sistema Cr/PCr (**Figura 7**) (AMES, 2000). Assim, a creatina tem efeitos benéficos em situações nas quais ocorrem distúrbios no metabolismo energético mitocondrial, como é o caso da DA e também da depressão (FERREIRA *et al.*, 2010).

**Figura 7.** A creatina no Sistema Nervoso Central.

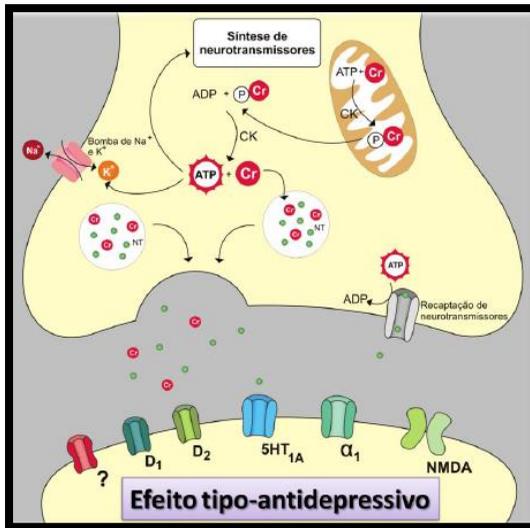


**Legenda:** A creatina pode ser sintetizada em astrócitos, neurônios e oligodendrócitos. A enzima L-arginina glicina amidinotransferase (AGAT) catalisa a conversão de glicina e arginina a ácido guanidinoacetato (GAA). A partir do GAA, a enzima guanidino acetato metil-transferase (GAMT) utiliza um grupo metil doado pela S-adenosilmetionina (SAM) e forma a creatina. Ela vai para o meio extracelular através de transportadores específicos (CRTs) e atuar em outros neurônios. A creatina sintetizada periféricamente ou proveniente da dieta ultrapassa a barreira hematoencefálica e chega ao encéfalo. Dentro de neurônios, a creatina pode ser interconvertida em fosfocreatina de acordo com a demanda energética, pela enzima creatina cinase(CC).

**Fonte:** figura cedida por Agatha Oliveira

Além disso, acredita-se que a creatina também tenha um papel neuromodulador no SNC, ela é armazenada em vesículas glutamatérgicas e GABAérgicas, sendo liberada na fenda sináptica mediante ondas de despolarização. A creatina parece interagir ativando receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos e  $\alpha$ 1-adrenérgicos, dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, bem como inibindo os receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos e NMDA (CUNHA *et al.*, 2013b; CUNHA *et al.*, 2013c) Também a creatina esta relacionada com a ativação de vias de sinalização intracelular mediada por PI3K/AKT, Nrf2/HO-1, mTOR, PKA, PKC, MEK/ERK  $\frac{1}{2}$  e CAMK-2 e de uma inibição de GSK-3 $\beta$  (CUNHA *et al.*, 2015) (CUNHA *et al.*, 2015). A interação da creatina com esses receptores estão relacionados com o efeito tipo-antidepressivo da creatina. (**Figura 8**) (ALMEIDA *et al.*, 2006). A grande quantidade de creatina cinase encontrada no hipocampo e no córtex frontal sugere a importância da creatina no desenvolvimento cerebral e nas funções cognitivas (KALDIS *et al.*, 1996).

**Figura 8.** Sistema creatina/fosfocreatina e papel neuromodulador.



**Legenda:** A manutenção do tampão energético da creatina inicia-se na mitocôndria, com a transferência de um grupamento fosfato do ATP para a creatina, pela creatina cinase mitocondrial (CK). A fosfocreatina formada segue então para o citosol onde é convertida à creatina e ATP, pela creatina cinase citosólica (CK). O ATP contribui para a manutenção dos níveis energéticos na célula nervosa, em atividades como recaptação de neurotransmissores (NT), transporte de vesículas, ativação de bombas dependentes de ATP, síntese de neurotransmissores, entre outras. Alguns estudos sugerem que a creatina possa ter um papel neuromodulador, sendo vesiculada e excitada em vesículas glutamatérgicas e GABAérgicas, podendo atuar em diversos receptores como os dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, serotoninérgicos 5-HT<sub>1a</sub>, α<sub>1</sub>-adrenérgicos, NMDA, sendo determinante para o efeito tipo-antidepressivo deste composto tipo-guanidina. Estuda-se a possibilidade de um receptor específico para a creatina embora não tenha sido clonado até o presente momento. **Fonte:** Imagem cedida por Priscila Batista.

Estudos também demonstram uma redução nos níveis de creatina em diversas regiões cerebrais de pacientes com depressão, principalmente no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo (NERY *et al.*, 2009; VENKATRAMAN *et al.*, 2009) e de fosfocreatina no encéfalo (KATO *et al.*, 1992; KATO *et al.*, 1994). A eficácia da suplementação da creatina como um potenciador dos efeitos de antidepressivos clássicos, como os inibidores de receptação de serotonina, em pacientes refratários ao tratamento já foi demonstrada em estudos clínicos (KONDO *et al.*, 2011; LYOO *et al.*, 2012). A creatina apresenta uma vantagem por apresentar início dos efeitos antidepressivos rápido (1 a 3 semanas), quando comparado com as terapias convencionais que podem demorar até 5 semanas para começar a apresentar efeito antidepressivo (NESTLER 2002). Outro ponto positivo da creatina é que a mesma não apresenta efeitos colaterais significativos (POORTMANS e FRANCAUX, 1999; KONDO *et al.*, 2001; LYOO *et al.*, 2012; NEMET e LEVINE, 2013).

Um estudo realizado no neocórtex de pacientes *postmortem* com DA, mostrou uma diminuição da atividade de creatina cinase citosólica quando comparado com o controle (AKSENOV *et al.*, 1997). Outro estudo realizado no giro médio temporal de pacientes com DA mostrou uma diminuição da atividade da creatina cinase citosólica nessa região, quando comparado com controle. Indicando que disfunção do sistema creatina/fosfocreatina pode estar relacionada com a DA (AKSENOV *et al.*, 2000).

Também a creatina parece inibir a GSK-3 $\beta$ , apresentando efeito tipo-antidepressivo relacionado com a inibição desta cinase, em um estudo em cultura de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, a creatina foi capaz de prevenir a desfosforilação (ativação) desta enzima (Ser9) induzida por 6-hidroxidopamina (CUNHA *et al.*, 2013a). A creatina apresenta efeito tipo-antidepressivo, demonstrado por nosso grupo, no teste de suspensão pela cauda (TSC) em camundongos (CUNHA *et al.*, 2010, 2013c). Este efeito parece estar relacionado com a via GSK-3 $\beta$ /Nrf-2/ HO-1 (CUNHA *et al.*, 2013a)(CUNHA *et al.*, 2015).

## 1.6 O MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO PELO PEPTÍDEO $\beta$ -AMILOIDE 1-40

O modelo experimental de doença de Alzheimer induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 é baseado na hipótese da cascata amiloide, no qual agregados de peptídeo  $\beta$ -amiloide são administrados via intracerebroventricular nos animais (HARDY e SELKOE, 2002). A administração desses agregados induz neurotoxicidade, gerando uma cascata de insultos celulares, causando lesões mitocondriais, distúrbio do metabolismo do cálcio, lesão do retículo endoplasmático, internalização de receptores, de neurotransmissores, inibição do sistema ubiquitinaproteossoma, inflamação e ativação da microglia, além de afetar mecanismos de formação de novas memórias. Nesse modelo não é observado a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares, que são marcadores da DA, porém esse modelo é bastante utilizado para rastreamento de novas drogas (GOTZ *et al.*, 2011; LAURIJSSENS, AUJARD e RAHMAN, 2013; PUZZO *et al.*, 2014).

Ainda, estudos demonstram que administração do peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 em camundongos mimetiza sintomas presentes na DA, prejudicando o processo de aquisição de memória no teste do labirinto aquático de Morris e no teste do reconhecimento do objeto novo (MEDEIROS *et al.*, 2007; PREDIGER *et al.*, 2007; TAKEDA *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2013). Além disso, a administração do A $\beta$ 1-40 em camundongos produz comportamentos tipo-depressivos em diferentes testes comportamentais, como o teste de suspensão pela cauda (TSC) e o teste do nado forçado (TNF). É importante destacar que nestes modelos preditivos a administração de fluoxetina, um ISRS e da desipramina, um ISRSN, reverte o comportamento tipo-depressivo neste modelo induzido pela administração de A $\beta$ 1-40 (PAMPLONA *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2013; LEDO *et al.*, 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Associação Internacional de Doença de Alzheimer (ADI) prevêem que o número de indivíduos com DA pode chegar a 67,5 milhões em 2050, conseqüentemente aumentaria o número de indivíduos acometidos com a comorbidade depressão/DA (GAUTHIER *et al.*, 2010).

Tendo em vista que:

- i) Pacientes com DA necessitam tomar medicamentos (anticolinesterásicos e/ou memantina) para o tratamento da doença, quando os mesmos apresentam sintomas neuropsiquiátricos, novos medicamentos são adicionados ao tratamento (NAGLIE *et al.*, 2011).
- ii) Os fármacos utilizados para tratar a depressão apresentam diversos efeitos colaterais, contribuindo fortemente para a diminuição da qualidade de vida do paciente, o que pode ser ainda mais prejudicial em pacientes já acometidos com DA (BEASLEY *et al.*, 1991; SANACORA, TRECCANI e POPOLI, 2012). Demonstrando assim grande necessidade do desenvolvimento de terapias antidepressivas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento convencional da depressão.
- iii) A suplementação com creatina, já conhecida por apresentar efeito antidepressivo em estudos clínicos e pré-clínicos (AMITAL *et al.*, 2006; ROITMAN *et al.*, 2007; KONDO *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2013b; CUNHA *et al.*, 2013c), é considerada bem tolerada por humanos. (POORTMANS e FRANCAUX, 1999). Por ser um agente neuroprotetor que não apresenta efeitos colaterais significativos (POORTMANS e FRANCAUX, 1999; BRAISSANT E HENRY, 2008), pode ser um agente promissor para o tratamento da depressão associada à DA.

Este trabalho pretende investigar o efeito do tratamento agudo com creatina em um modelo de comportamento tipo-depressivo

induzido pela administração do peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40, verificando a participação da via GSK-3 $\beta$ /Nrf2/HO-1. Considerando o impacto social da depressão associada à DA, esperamos contribuir para o estabelecimento de possíveis alternativas terapêuticas que possam auxiliar no tratamento convencional para essas enfermidades, bem como expandir os conhecimentos da fisiopatologia da depressão quando associada à DA e do efeito tipo-antidepressivo da creatina.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial farmacológico da creatina administrada agudamente, em um modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40. Para este fim, serão analisados em camundongos parâmetros comportamentais e bioquímicos referentes a uma possível via de sinalização implicada neste efeito, a via GSK-3 $\beta$ /Nrf2/HO-1.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Em um modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40, verificar:

- a) O efeito da administração aguda de creatina no TSC, TCA e TBS.
- b) Verificar o imunoconteúdo de proteínas, como GSK-3 $\beta$  e HO-1, em amostras do hipocampo de animais tratados agudamente com creatina.
- c) Verificar os níveis de GSH, em amostras de hipocampo de animais tratados agudamente com creatina.
- d) Verificar a atividade enzimática da GR e TrxR, em amostras de hipocampo de animais tratados agudamente com creatina.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais propostos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (PP00795). Camundongos *Swiss* fêmeas, pesando entre 30-45g, com idade entre 45-60 dias foram utilizados. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente de 20-22°C com livre acesso a água e comida, em ciclo claro escuro de 12:12h (07:00-19:00). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Todos os experimentos foram realizados entre 13h e 17h. Os animais foram ambientados no local onde serão realizados os experimentos 24h antes dos testes comportamentais e distribuídos de maneira aleatória nos grupos experimentais (n=9-12 animais por grupo). Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do COBEA e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

### 4.2 FÁRMACOS E TRATAMENTO

#### Modelo do peptídeo $\beta$ -amiloide 1-40

A indução do comportamento tipo-depressivo foi realizada pela administração de peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/3 $\mu$ l/animal) por via intracerebroventricular (i.c.v.) dez dias antes dos testes comportamentais (PAMPLONA *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2013). Como descrito por Coraci e colaboradores (ano), o fragmento A $\beta$ 1-40 (SigmaAldrich, USA) foi diluído em PBS (pH 7,4; 1 mg/ml) e incubado a 37°C durante 4 dias, para induzir agregação. Para administração i.c.v. da forma agregada do peptídeo, os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano (1 mg/ml; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Brasil). Este procedimento foi necessário para contenção dos animais possibilitando a administração do peptídeo, o qual foi administrado utilizando uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton 25  $\mu$ l. A agulha foi inserida perpendicularmente no crânio, diretamente no ventrículo lateral esquerdo, utilizando o bregma como referência. O local da injeção foi de 1 mm para a direita ou a esquerda do ponto médio de

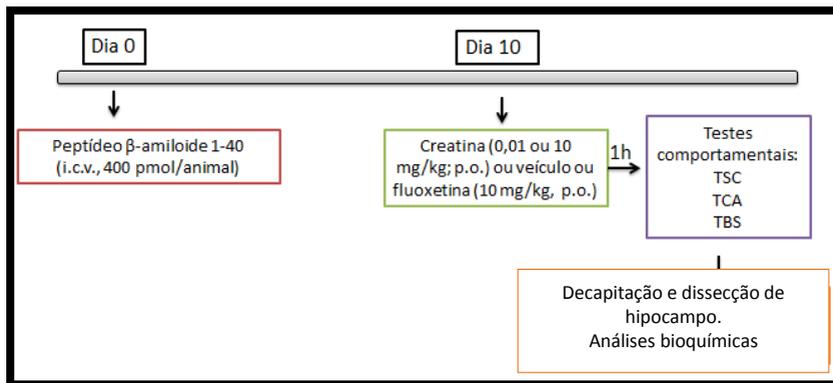
uma linha traçada até a base anterior das orelhas (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade) (DOS SANTOS *et al.*, 2013).

A creatina monohidratada (Amerifit, USA) e a fluoxetina (Teuto/Pfizer, Brasil), um ISRS, foram diluídos em água destilada e administrados por via oral.

### **Avaliação do efeito da creatina em um modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo A $\beta$ 1-40.**

A fim de verificar o efeito da creatina no modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40, os animais receberam administração de peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/3  $\mu$ l/animal, i.c.v), após recuperação os mesmos foram colocados no vamente em suas caixas. Para ambientação dos animais eles foram colocados na sala de experimento 24 horas antes dos testes comportamentais, por fim no décimo dia após a administração do peptídeo  $\beta$ -amiloide, os animais receberam uma única administração de creatina (0,01 ou 10 mg/kg, p.o.), ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o., controle positivo), e 60 minutos após as administrações os mesmos foram submetidos aos seguintes testes: TSC, TCA e ao TBS, sem intervalo de tempo entre os testes, sendo em seguida decapitados para remoção do hipocampo e avaliação dos parâmetros bioquímicos (**Figura 9**).

**Figura 9.** Esquema do protocolo experimental.



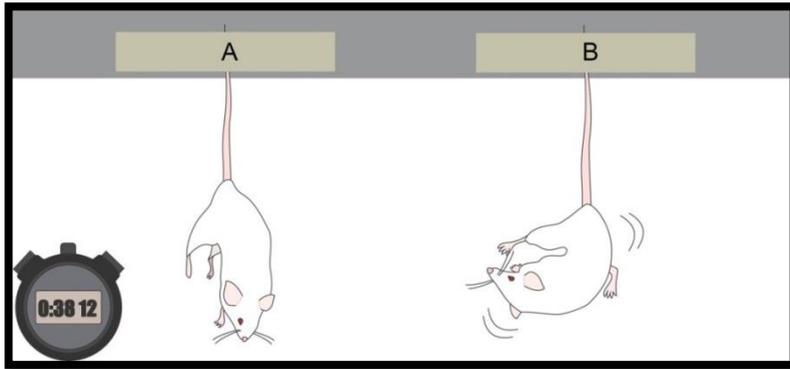
**Legenda:** i.c.v., intracerebroventricular; p.o., via oral; TSC, teste de suspensão pela cauda; TCA, teste do campo aberto, TBS, teste de borrifagem de sacarose.

**Fonte:** do autor.

#### 4.3 TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA (TSC)

O TSC é um teste baseado na observação de que os animais submetidos a uma situação inescapável, após um período de agitação inicial, adotam uma postura de imobilidade. O teste tem validade preditiva, pois com o uso de antidepressivos clássicos o tempo de imobilidade é diminuído. Nesse teste, os camundongos foram suspensos 50 cm acima do chão e presos pela extremidade da cauda por fita adesiva e o tempo de imobilidade (em segundos) foi registrado durante 6 minutos (**Figura 10**) (STERU *et al.*, 1985).

**Figura 10.** Teste de suspensão pela cauda



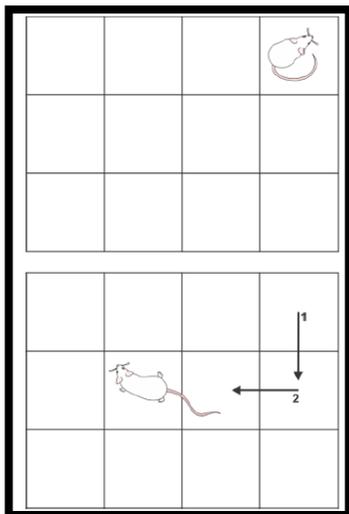
**Legenda:** A) Representa o animal imóvel e B) representa o animal em movimento.

**Fonte:** imagem cedida por Ágatha Oliveira.

#### 4.4 TESTE DO CAMPO ABERTO (TCA)

Com objetivo de excluir a possibilidade de um efeito psicoestimulante ou sedativo dos compostos administrados, os animais foram submetidos ao TCA (RODRIGUES *et al.*, 2002). Nesse teste, 60 minutos após a administração de creatina, fluoxetina ou veículo, os animais foram colocados em uma caixa de madeira medindo 40X60X50 cm (largura/comprimento/altura), onde o chão é dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados pelo animal com as quatro patas foi registrado durante 6 minutos (**Figura 11**). Após o teste o aparato foi devidamente higienizado com papel toalha umedecido em álcool 10%.

**Figura 11.** Teste do campo aberto.

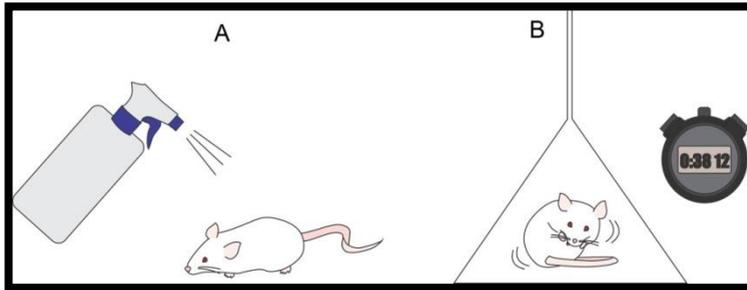


**Fonte:** imagem cedida por Ágatha Oliveira.

#### 4.5 TESTE DE BORRIFAGEM DE SACAROSE (TBS)

Nesse teste, uma solução de sacarose 10% foi borrifada no dorso dos animais, os quais posteriormente foram colocados em uma caixa de acrílico (9 x cm x 7 cm x 11cm) (**Figura 12**). O comportamento de autolimpeza e a latência para início do mesmo foi registrada por um período de 5 minutos. No TBS é possível observar um comportamento tipo anedônico e motivacional, sendo que compostos antidepressivos aumentam o tempo de autolimpeza e diminuem o tempo de latência para iniciar este comportamento (WILLNER, 2005; MORETTI *et al.*, 2012).

**Figura 12.** Teste de borrifagem de sacarose.



**Fonte:** Imagem cedida por André Roberto da Silva Colla.

#### 4.6 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

O imunoconteúdo de GSK-3 $\beta$  e HO-1 no hipocampo dos animais submetidos ao modelo do peptídeo  $\beta$ -amiloide foram determinados por meio de imunodeteção por Western Blot, de acordo com protocolo descrito em trabalho realizado pelo nosso grupo (MORETTI *et al.*, 2013).

Após a submissão aos tratamentos, todos os animais foram decapitados e o encéfalo de cada animal foi removido e os hipocampus foram rapidamente dissecados (4°C), colocados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas segundo Oliveira *et al.* (2008). Os tecidos hipocampais foram homogeneizados mecanicamente em 200  $\mu$ L de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e 34 Cocktail inibidor de proteases). O homogenato foi centrifugado (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares, e o sobrenadante (300  $\mu$ l) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4mM, SDS 8%) e aquecidos a 100°C por 5 min. Após homogeneização uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se numa proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25mM e azul de bromofenol, pH 6,8). O conteúdo proteico foi estimado através do

método adaptado de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951) e a concentração proteica estimada a partir de uma curva padrão de soro albumina bovina. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 10%) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%. Após este processo, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado 5% TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5).

As membranas foram incubadas com anticorpos da Cell Signaling® anti- fosfo-GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) (1:1000) e anti-GSK-3 $\beta$  (1:1000), e com anticorpos da Santa Cruz anti-HO-1 (1:500) e anti- $\beta$ -actina (1:250) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel. As proteínas foram verificadas na mesma membrana e os imunocomplexos foram removidos conforme descrito previamente por (POSSER *et al.*, 2007). De forma simplificada, as membranas foram lavadas uma vez com água deionizada (5 minutos), em seguida foram incubadas com NaOH 0,2 M (5 minutos), lavadas com deionizada (5 minutos) e por último com TBS-T (5 minutos). As membranas ficaram incubadas com o anticorpo de interesse *overnight* a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-*rabbit* ou anti-*mouse* (conforme descrito pelo fabricante de cada anticorpo) conjugado com peroxidase (1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante e com uso do equipamento de revelação Chemidoc® (Bio-Rad Laboratories). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T.

A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando ScionImage software® (Frederick, MD, EUA). O nível de fosforilação da GSK-3 $\beta$  (Ser<sup>9</sup>) foi determinado pela razão entre a DO fosforilada / DO total. Para as outras proteínas foi feita a razão DO proteína total

/DO  $\beta$ -actina. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

#### 4.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Para as análises dos parâmetros de estresse oxidativo, o hipocampo foi homogeneizado em 10 volumes de tampão fosfato (50 mM, pH 7.4). Os homogenatos todo tecido foram centrifugados a 1.000 x g durante 10 min a 4 °C, para eliminação de núcleo e fragmentos celulares. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para as determinações.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA

Para determinar os níveis de GSH do hipocampo, foi utilizado o método fluorimétrico de HISSIN e HILF, 1976, com algumas modificações. Este método baseia-se no princípio de que os grupos tióis da GSH reagem especificamente com orto-fitalaldeído (OPT) em pH 8, resultando na formação de um produto fluorescente que absorve luz em 350 nm e emite luz em 420 nm. Após homogeneização, uma alíquota do tecido foi misturado ao ácido perclórico (0,6 M), e centrifugado a 1000 x g durante 10 min a 4 °C para a precipitação de proteínas. Posteriormente ao sobrenadante foi adicionado a 1,8 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8.0 e a 100  $\mu$ l de OPT (1 mg/ml), que foi medido a fluorescência no espectrofotômetro (TECAN - Áustria).

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE

A atividade da enzima glutatona redutase (GR) foi determinada pelo método de CARLBERG e MANNERVIK (1975). Neste método a glutatona redutase catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG) em presença de NADPH. A amostra foi adicionada a um meio de reação (MIX) contendo 50 mM de tampão fosfato pH 7,0 e 0,24 mM de NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 1,0 mM de glutatona oxidada. O consumo de NADPH para NADP<sup>+</sup> foi monitorado por 5 min a 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em unidades. Uma unidade de GR corresponde à formação de 1,0  $\mu$ mol de NADP<sup>+</sup> a partir de NADPH por minuto, a pH 7,4 e 37 °C (utilizando um coeficiente extinção molar de 6,22 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para NADPH).

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIORREDOXINA REDUTASE

A atividade da TrxR foi medida utilizando o método descrito por (HOLMGREN e BJORNSTEDT, 1995). Resumidamente, a reação foi iniciada pela adição de 20  $\mu$ l de homogenato em 200  $\mu$ l de MIX, contendo DTNB 5 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM e BSA 0,2 mg em pH 7,4. Após 5 min de leitura espectrofotométrica, foi adicionado à reação 10  $\mu$ l de NADPH na concentração final de 0,2 mM, e a redução do DTNB para TNB foi monitorado a 412 nm por 5 min no espectrofotômetro (TECAM, Áustria). Os resultados foram expressos em nmol de NADPH consumido por mim por mg de proteínas.



## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros comportamentais e bioquímicos foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk para analisar a normalidade. Quando considerados normais, os resultados seguiram para análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado. Foram considerados significativos os valores para  $P < 0,05$ . Para os cálculos estatísticos foi usado o programa Statistica 7.0. StatSoft. Inc.®

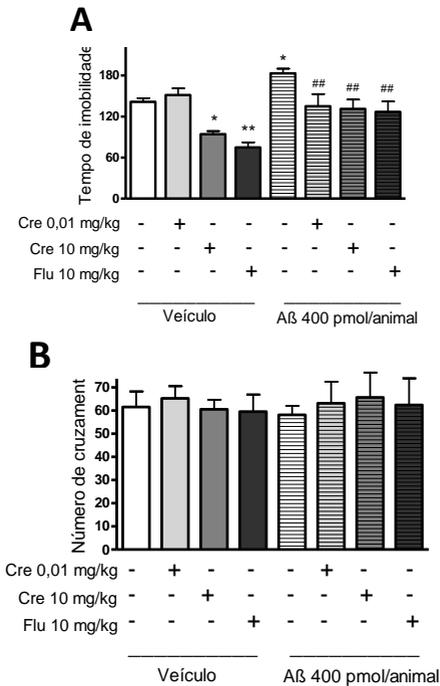


## 6. RESULTADOS

### EFEITO DA CREATINA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO $\beta$ -AMILOIDE 1-40.

A **Figura 13**, painel **A** mostra que a administração aguda sistêmica (p.o.) de creatina (10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) produziu uma redução no tempo de imobilidade dos animais no TSC ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente), quando comparados com camundongos do grupo controle, enquanto a dose de creatina (0,01 mg/kg) não foi capaz de alterar esses parâmetros de mobilidade analisados. Além disso, a administração de peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/animal, i.c.v.) aumentou o tempo de imobilidade dos animais no TSC ( $p < 0,01$ ), um efeito que foi revertido pela administração de creatina (0,01 e 10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) ( $p < 0,01$ ). No painel **B** a análise da atividade locomotora não demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA.

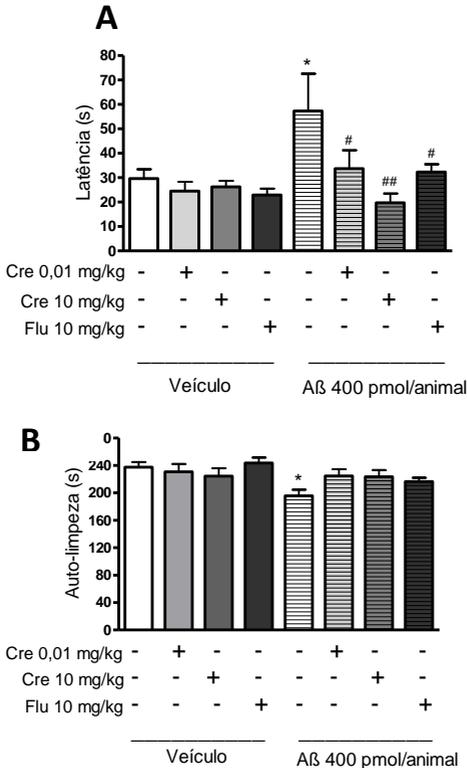
**Figura 13.** Efeito do tratamento agudo com creatina (0,01 e 10 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no TSC (A) e no TCA (B), em um modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.



Os valores são expressos como média + E.P.M. (n= 9-12). \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , quando comparado com o grupo controle (veículo + veículo), # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , quando comparado ao grupo A $\beta$  (A $\beta$  + veículo). Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* Newman-Keul.

Na **Figura 14**, painel **A** no TBS a administração aguda sistêmica (p.o.) de creatina (10mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg), não alteraram a latência para o início do comportamento de autolimpeza, quando comparado ao grupo dos animais controles. A administração de peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/animal, i.c.v.) aumentou o tempo de comportamento de autolimpeza no TBS, um efeito que foi prevenido pela administração de creatina (0,01 e 10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ , respectivamente). Ainda nesta figura, painel **B** a administração de peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/camundongo, i.c.v.) diminuiu o tempo total do comportamento de autolimpeza dos animais quando comparado com o grupo controle e, os tratamentos com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) foram capazes de reverter este comportamento.

**Figura 14.** Efeito do tratamento agudo com creatina (0,01 e 10 mg/kg, p.o.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no TBS. (A) Tempo de latência para o comportamento de autolimpeza e (B) tempo total de autolimpeza, em um modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.



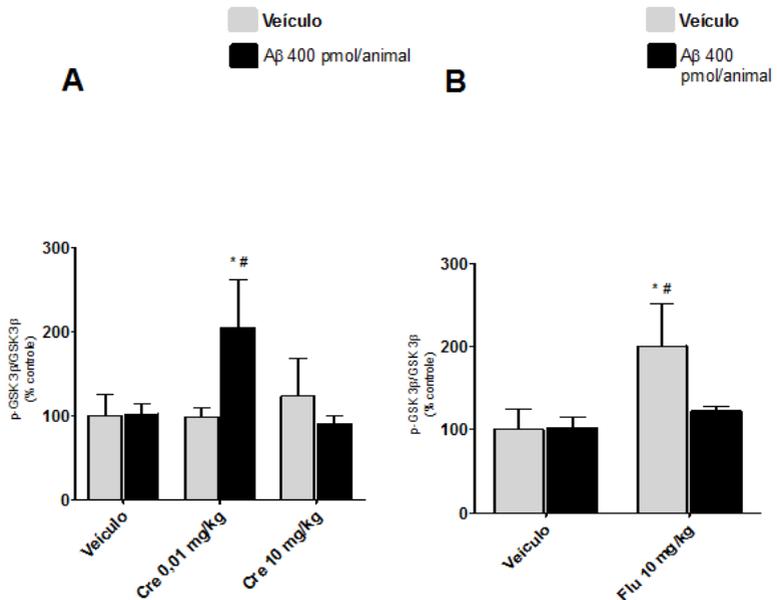
Os valores são expressos como média + E.P.M. (n= 9-12). \* p<0,05, \*\*p<0,01, quando comparado com o grupo controle (veículo + veículo), #p<0,05, ##p<0,01, quando comparado ao grupo A $\beta$  (A $\beta$  + veículo). Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

EFEITO DO TRATAMENTO COM CREATINA NA VIA GSK-3 $\beta$ /Nrf-2/HO-1 EM UM MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO  $\beta$ -AMILOIDE 1-40.

Os resultados apresentados nas figuras abaixo mostram a expressão das proteínas GSK-3 $\beta$  e heme-oxigenase-1 no hipocampo dos animais, utilizando a técnica do western blotting.

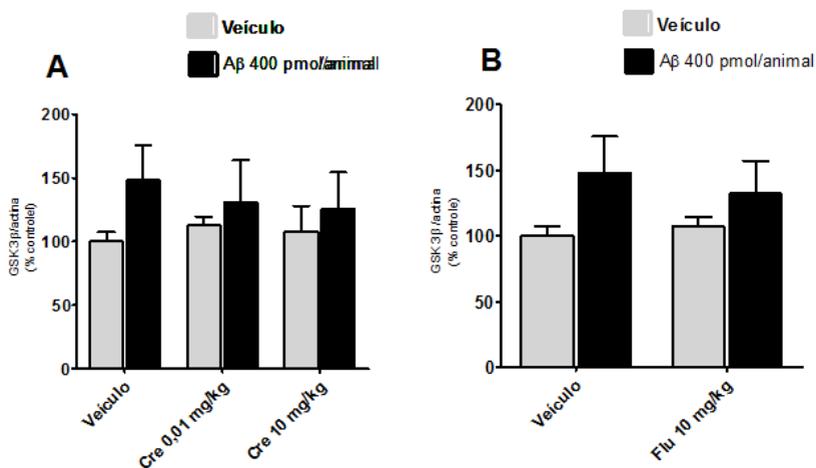
Na **Figura 15 e 16**, no painel **A**, houve um aumento na fosforilação de GSK-3 $\beta$  no hipocampo dos animais que receberam a creatina (0,01 mg/kg) após injeção de peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/animal, i.c.v.), em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e ao grupo tratado apenas com peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/animal, i.c.v.) ( $p < 0,05$ ). No painel **B**, é possível observar que a fluoxetina (10 mg/kg) *per se* aumentou a fosforilação de GSK-3 $\beta$ , quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e ao grupo tratado apenas com peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 ( $p < 0,05$ ). Nos painéis **A e B da figura 16** é possível observar que não houve alteração no imunoconteúdo de GSK-3 $\beta$  no hipocampo dos animais.

**Figura 15.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) (Painel A) e de fluoxetina (10 mg/kg) (Painel B) sobre o imunocontéudo hipocampal de p-GSK-3 no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.



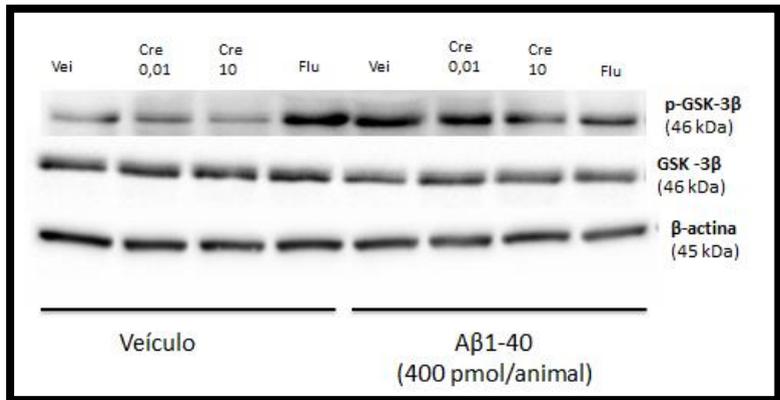
Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=5). \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (veículo + veículo), #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo A $\beta$  (A $\beta$  + veículo). Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

**Figura 16.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) (Painel A) e de fluoxetina (10 mg/kg) (Painel B) sobre o imunoconteúdo hipocampal de GSK-3 $\beta$  (painéis A e B) no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.



Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=5). \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (veículo + veículo), # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo A $\beta$  (A $\beta$  + veículo). Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

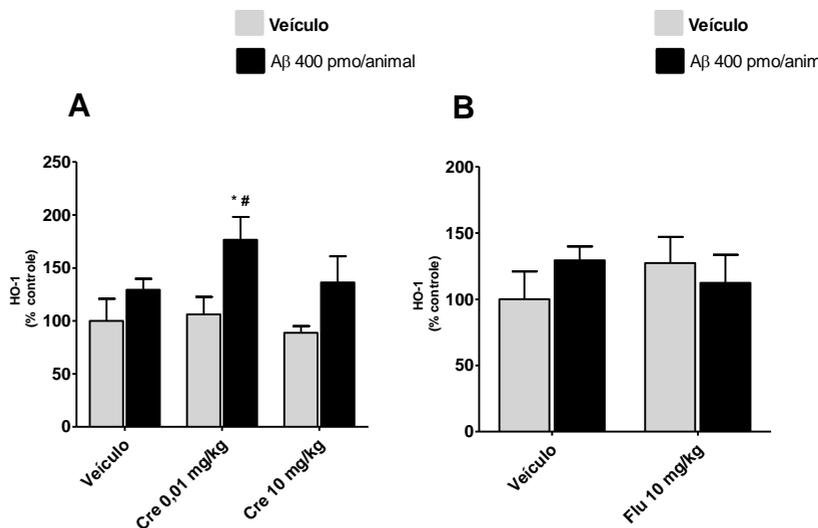
**Figura 17.** Imagem representativa do efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e de fluoxetina (10 mg/kg) sobre o imunocontéudo hipocampal de GSK-3 $\beta$  e p-GSK-3 $\beta$  no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.



**Legenda:** Imagem representativa de Western Blotting. Abreviações: Cre, creatina; Flu, fluoxetina, Veil, veículo

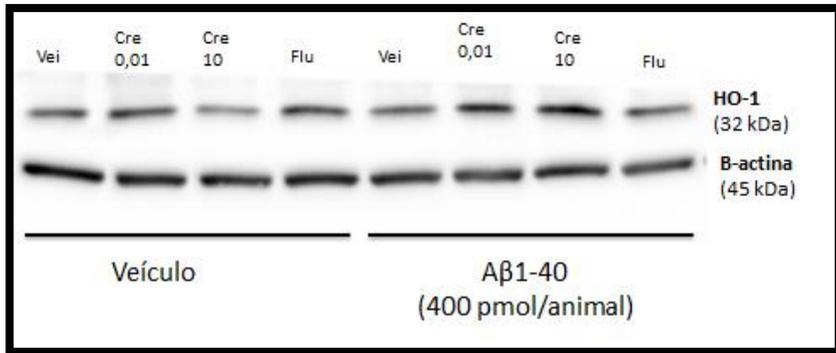
Na **Figura 18.** no painel A, houve um aumento no imunocontéudo de HO-1 no hipocampo dos animais que receberam a creatina (0,01 mg/kg) após a injeção de peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40, em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e ao grupo tratado apenas com peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 ( $p < 0,05$ ). No painel B, é possível observar que a administração de fluoxetina (10 mg/kg) não alterou o imunocontéudo de HO-1 no hipocampo dos animais.

**Figura 18.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) (Painel A) e de fluoxetina (10 mg/kg) (Painel B) sobre o imunoconteúdo hipocampal de HO-1 no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.



Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=5). \*  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (veículo + veículo), #  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo A $\beta$  (A $\beta$  + veículo). Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keus. Abreviações: Cre, creatina; Flu, fluoxetina, vei, veículo.

**Figura 19.** Imagem representativa do efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e de fluoxetina (10 mg/kg) sobre o imunocontéudo hipocampal de HO-1 no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.

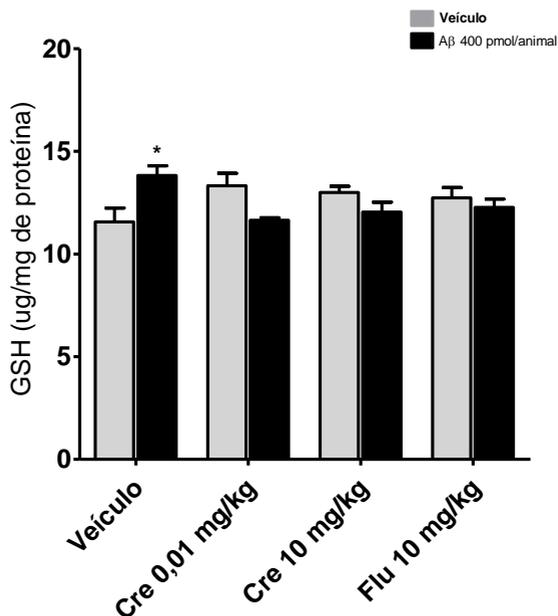


**Legenda:** Imagem representativa de Western Blotting. Abreviações: Cre, creatina; Flu, fluoxetina, Vei, veículo

EFEITO DO TRATAMENTO COM CREATINA SOBRE O NÍVEL DE GSH NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO  $\beta$ -AMILOIDE 1-40.

Na **Figura 20** é possível observar um aumento nos níveis de GSH no hipocampo dos animais que foram tratados com peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/animal, i.c.v.) em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Todavia o grupo  $\beta$ -amiloide tratado com creatina (ambas as doses) e fluoxetina foram capazes de manter os níveis de GSH semelhante ao controle.

**Figura 20.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e de fluoxetina (10 mg/kg) sobre os níveis de GSH hipocampal no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.



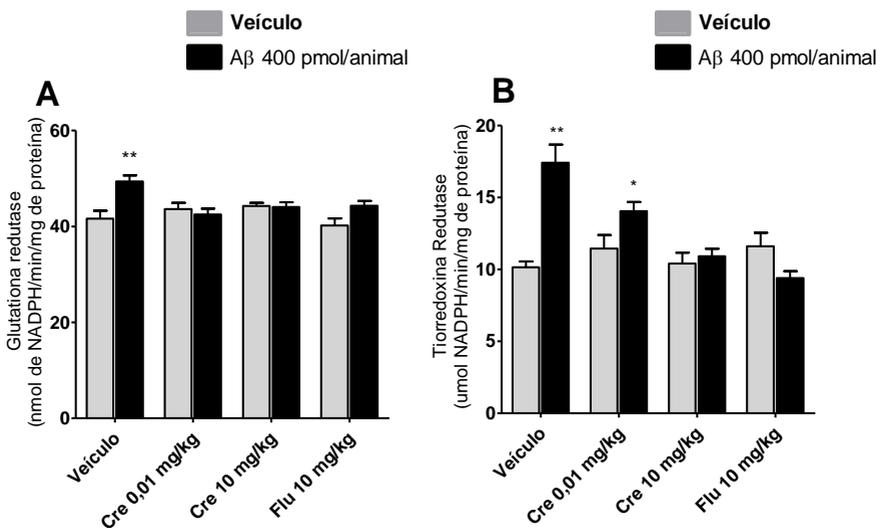
Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=5). \* P<0,05 quando comparado com o grupo controle (veículo + veículo). Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Abreviações: Cre, creatina; Flu, fluoxetina.

**EFEITO DO TRATAMENTO COM CREATINA SOBRE A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DEPENDENTES DA ATIVAÇÃO DE Nrf2 NO HIPOCAMPO DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO  $\beta$ -AMILOIDE 1-40.**

Na **Figura 21** no painel **A**, é possível observar um aumento na atividade da enzima GR no hipocampo dos animais que foram tratados com peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/animal, i.c.v.) em relação ao grupo controle (p<0,001). Entretanto, os animais tratados com creatina e fluoxetina mais  $\beta$ -amiloide mantiveram a atividade enzimática ao nível do controle. Da mesma forma, no painel **B**, é possível visualizar um aumento da atividade da TRXR no hipocampo do grupo tratado com

peptídeo  $\beta$ -amiloide comparado com controle ( $p < 0,0001$ ). Além disso, foi possível observar um aumento na atividade desta enzima no hipocampo dos animais que foram tratados com creatina (0,01 mg/kg, p.o.) após a injeção de peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 (400 pmol/animal, i.c.v.), quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0013$ ). Porém esse efeito não foi observado no grupo tratado com creatina (10 mg/kg, p.o.) e fluoxetina após indução com o peptídeo  $\beta$ -amiloide.

**Figura 21.** Efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e de fluoxetina (10 mg/kg) sobre a atividade de GR (painel A) e TrxR (painel B) no hipocampo dos animais no modelo de depressão induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.



Os valores são expressos como média + E.P.M. ( $n=5$ ). \*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo controle (veículo + veículo). Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Abreviações: Cre, creatina; Flu, fluoxetina.

## 7. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da administração aguda de creatina em um modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo A $\beta$ 1-40. Uma via de sinalização comum na depressão e na DA é a via da GSK-3 $\beta$ /Nrf2/HO-1. Assim, além da avaliação comportamental investigamos o envolvimento desta via de sinalização no efeito da creatina no modelo proposto.

O modelo do peptídeo A $\beta$ 1-40 é classicamente utilizado para estudar novos compostos que auxiliem no tratamento da DA, por mimetizar sintomas da doença (TAKEDA *et al.*, 2009). Porém recentemente foi observado nesse modelo que sintomas tipo-depressivos antecedem os sintomas de déficit cognitivos e de memória (PAMPLONA *et al.*, 2010). Assim esse modelo torna-se uma possível ferramenta experimental para auxiliar no melhor entendimento da depressão associada a DA, possibilita também a descoberta de novos compostos para serem utilizados posteriormente na clínica.

Entretanto, a administração do A $\beta$ 1-40 causou um efeito tipo-depressivo no TSC. O TSC é um modelo experimental muito usado para avaliação da atividade antidepressivas de compostos. Nesse este, os animais são submetidos a uma situação inescapável e o tempo de imobilidade é mensurado a diminuição desse é considerado um efeito tipo-antidepressivo e o aumento desse tempo é considerado um comportamento tipo-depressivo. Diferentes trabalhos demonstraram a capacidade da administração de A $\beta$ 1-40 em causar comportamento tipo depressivo em modelos preditivos para depressão. DOS SANTOS *et al.* (2013) demonstrou o efeito tipo-depressivo do A $\beta$ 1-40 no TSC e PAMPLONA *et al.* (2010) também demonstrou esse efeito no TNF, teste que utiliza o mesmo princípio do TSC.

No TBS a administração de A $\beta$ 1-40 também causou um comportamento tipo-depressivo, por aumentar o tempo de latência para o comportamento de autolimpeza e por diminuir o tempo total de autolimpeza no teste. Outros modelos de depressão como o estresse crônico imprevisível (MORETTI *et al.*, 2012; MUTLU *et al.*, 2012; FRANCESCHELLI *et al.*, 2015) e a bulbectomia olfatória (FREITAS *et al.*, 2013) apresentam o mesmo perfil que a administração de A $\beta$ 1-40 no TBS. O TBS, por sua vez, é um teste comportamental utilizado para verificação do comportamento tipo-anedônico e motivacional, no qual os animais realizam um comportamento de autolimpeza após a

borrifagem de uma solução de sacarose em seu dorso. Modelos animais de depressão causam uma diminuição do comportamento de autolimpeza, assim como o aumento da latência para iniciar este comportamento, e a administração de antidepressivos revertem essas. Dentre os sintomas presentes na depressão, a anedonia é um sintoma bastante evidente nos pacientes que possuem depressão e DA (WILLNER, 2005).

A administração aguda *per se* de creatina (10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) apresentou um efeito tipo-antidepressivo no TSC, como já demonstrado em trabalhos do grupo (CUNHA *et al.*, 2013c; CUNHA *et al.*, 2015). De fato, diferentes classes de antidepressivos como inibidores da recaptção de monoaminas, tricíclicos e inibidores da enzima monoamina oxidase, reduzem o tempo de imobilidade no TSC. Ainda, o TSC é um teste sensível à administração aguda de substâncias com efeito tipo-antidepressivo (MCARTHUR e BORSINI, 2006). A dose de creatina de 0,01 mg/kg, que não apresentou efeito tipo-antidepressivo *per se*, foi efetiva em prevenir o efeito tipo-depressivo causado pela administração do A $\beta$ 1-40. Isso pode ter ocorrido pelo fato do dano causado pelo A $\beta$ 1-40 como aumento de estresse oxidativo, neuroinflamação e disfunção mitocondrial, devido à interação do A $\beta$ 1-40 com a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (RODRIGUES, PETERSEN e PERRY, 2014). Assim, uma pequena dose de creatina pareceu ser suficiente para mostrar alterações no teste comportamental. Isto também ocorreu com agmatina no modelo do TNF- $\alpha$ , que é utilizado para mimetizar sintomas a depressão (NEIS *et al.*, 2014) e também com a vitamina E no mesmo modelo (MANOSSO *et al.*, 2013). Ainda, os grupos que foram submetidos à administração de A $\beta$ 1-40 e posteriormente receberam creatina (10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) também apresentaram efeito tipo-antidepressivo no TSC. Por não apresentar nenhuma alteração na atividade locomotora no TCA, é possível concluir que a creatina e a fluoxetina possuem de fato efeito tipo-antidepressivo e que o A $\beta$ 1-40 possui efeito tipo-depressivo.

No TBS, as doses de creatina (0,01 e 10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) *per se* não mostraram efeito na diminuição do tempo de latência para iniciar o comportamento de autolimpeza. Porém as doses creatina (0,01 e 10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) foram capazes de impedir o esse aumento causado pela administração do A $\beta$ 1-40. Também essas doses de creatina e fluoxetina foram capazes de impedir parcialmente a diminuição do tempo total de autolimpeza no TBS, causado pela

administração de A $\beta$ 1-40, caracterizando um efeito tipo-antidepressivo dos compostos nesse teste.

A depressão na DA é tratada com antidepressivos convencionais, que apresentam diversos efeitos colaterais, que são somados aos efeitos colaterais dos fármacos utilizados para tratar a DA, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (KIM, KIM e KONG, 2013). Outra limitação nessa comorbidade é o diagnóstico, o qual ainda não possui parâmetros bem estabelecidos. Dentre os manuais utilizados para diagnóstico de depressão na DA estão o DSM-V, a Escala Cornell de depressão em demência (ECDD), (Critérios para depressão na doença de Alzheimer – PDCdAD) entre outros, mas ainda não há consenso de qual a melhor maneira para realização do diagnóstico (ENGEDAL *et al.*, 2011).

Em relação aos ensaios bioquímicos realizados neste trabalho, foi observado que a administração de creatina na dose de 0,01 mg/kg aumentou a fosforilação de GSK-3 $\beta$  no resíduo de serina 9 e o imunoconteúdo de HO-1 no homogenato total de hipocampo dos animais que foram submetidos à administração do peptídeo  $\beta$ -amiloide. A GSK-3 $\beta$  quando fosforilada no resíduo de tirosina 216 é ativada e as funções *downstream* benéficas exercidas pelo Nrf2 não ocorrem. Porém quando fosforila no resíduo de serina 9, a GSK-3 $\beta$  é inibida, assim Nrf2 transloca para o núcleo e como consequência a HO-1 é transcrita (JOPE e ROH, 2006; GOZZELINO, JENEY e SOARES, 2010). A via da GSK-3 $\beta$  parece estar entre os mecanismos que medeiam a relação entre depressão e DA. Nas duas patologias observa-se uma redução do aporte neutrófico e estimulação de cascatas pró-inflamatórias, que estão direta ou indiretamente relacionadas ao aumento da atividade de GSK-3 $\beta$  (LEONARD, 2007; CARACI *et al.*, 2010).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa, demonstrou que a creatina aumenta a fosforilação de AKT e no mesmo estudo também é mostrado que sua atividade antidepressiva depende de PI3K (CUNHA *et al.*, 2015), com essas evidências parece que a fosforilação da GSK-3 $\beta$  pela creatina pode ser dependente da ativação da via AKT/PI3K. A inibição da GSK-3 $\beta$  pela fluoxetina já foi demonstrada por outros grupos de pesquisa (SU *et al.*, 2012; HUI *et al.*, 2015), devido a esta característica da fluoxetina, a mesma foi escolhida para ser controle positivo nesse trabalho. Neste trabalho, de maneira semelhante ao demonstrado na literatura, fluoxetina (10 mg/kg) *per se* aumentou a fosforilação de GSK-3 $\beta$  no hipocampo dos animais. A administração de

A $\beta$ 1-40 não mostrou alteração na fosforilação de GSK-3 $\beta$  no resíduo de serina 9, pois possivelmente o peptídeo estaria fosforilando o resíduo de tirosina 216, e ativando essa cinase. Um estudo realizado em células PC12, demonstrou que após 24 horas do tratamento com peptídeo A $\beta$ 1-42 ocorreu um aumento na fosforilação de GSK-3 $\beta$  no resíduo de serina 216 (KIM, E. A. *et al.*, 2015; KIM, H. G. *et al.*, 2015).

O aumento do imunocontéudo de HO-1 pela creatina em camundongos *Swiss* machos, já foi demonstrado em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, no qual foi verificado um aumento no imunocontéudo de HO-1 no hipocampo de animais tratados com creatina (1 mg/kg) (CUNHA *et al.*, 2015). Porém, este é o primeiro estudo a avaliar o efeito da creatina no modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pela administração do peptídeo A $\beta$ 1-42. No mesmo estudo citado anteriormente foi demonstrado que a atividade antidepressiva da creatina é dependente de Nrf2/HO-1. O aumento de HO-1 pode ser devido à inibição de GSK-3 $\beta$  e consequente translocação de Nrf2 para o núcleo (KASPAR, NITURE e JAISWAL, 2009). A ativação de Nrf2/HO-1 promove uma ação citoprotetora, pois o grupo heme livre é catabolizado pela HO-1 em ferro, monóxido de carbono e biliverdina, impedindo que a célula sofra morte celular programada (GOZZELINO, JENEY e SOARES, 2010). Uma contradição nesse efeito citoprotetor, é que a liberação de ferro poderia contribuir para formação de radicais livres (reação de Fenton), mas o organismo tem mecanismos de neutralizar o ferro liberado nessa reação (BAKER, ANDERSON e BAKER, 2003). Esse efeito citoprotetor é importante para manter a homeostase redox na depressão e na DA.

Outras proteínas como a GR e a TrxR, também dependem da ativação de Nrf2. Este fator de transcrição em condições basais está ligado a Keap1, uma proteína que se liga ao Nrf2 e promove sua degradação pelo sistema proteossoma ubiquitina, no citosol. Em uma situação de estresse oxidativo o Nrf2 é fosforilado no resíduo de serina 40 e translocado para o núcleo, onde se liga ao ARE e regula a atividade de transcrição de seus genes alvo (BLOOM e JAISWAL, 2003). Alguns desses genes são responsáveis por transcrever enzimas antioxidantes, como a glutationa redutase e a tiorredoxina redutase. Os níveis de glutationa também estão aumentados nos animais que

receberam a injeção de peptídeo  $\beta$ -amiloide, isto pode ter ocorrido devido ao fato de sua enzima de síntese, a gama-glutamyl-cisteína sintetase, depender da ativação de Nrf2 para ser transcrita (BRIGELIUS-FLOHE e MAIORINO, 2013).

Neste trabalho foi mostrado um aumento na atividade dessas enzimas quando expostas a administração do peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40. Um estudo mostrou que no cérebro de pacientes com DA há um aumento na atividade da TrxR (LOVELL *et al.*, 2000). Estudos utilizando camundongos *Swiss* e o mesmo modelo apresentado neste trabalho, mostram aumento na atividade da GR no hipocampo dos animais (PREDIGER *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2013). Outros estudos utilizando o modelo do estresse de restrição, um modelo animal utilizado para estudar depressão, também mostram aumento da atividade de enzimas antioxidantes no hipocampo dos animais (BUDNI *et al.*, 2013; MORETTI *et al.*, 2013).

Outro estudo mostra que em um estágio inicial de demência há um aumento da fosforilação de Nrf2 no resíduo de serina 40, o qual leva a um aumento de sua translocação para o núcleo e como consequência aumento na transcrição de genes. No mesmo estudo, também foi mostrado uma tendência ao aumento da fosforilação de serina 40 em camundongos 3xTg-AD (modelo animal triplo transgênico para DA) jovens (MOTA *et al.*, 2015). Estes resultados da literatura estão de acordo com o modelo usado, que mimetiza aspectos encontrados no estágio inicial da DA como déficits cognitivos, disfunção sináptica, neuroinflamação entre outros, porém neste modelo não são encontrados placas amiloides e emaranhados neurofibrilares (PREDIGER *et al.*, 2007; TAKEDA *et al.*, 2009). Outra explicação para o aumento da atividade dessas enzimas é o fato de que a proteína Keap1 possui resíduos de cisteína reativas, que podem ser oxidadas a ácido sulfênico causando uma mudança em sua estrutura que desestabiliza o complexo com Nrf2 e o mesmo é translocado para o núcleo (SOUZA *et al.*, 2013). O aumento da atividade das enzimas GR e TrxR e dos níveis de glutathiona no hipocampo dos animais expostos ao A $\beta$ 1-40, pode ter ocorrido em uma tentativa de evitar um quadro de estresse oxidativo em decorrência da exposição do peptídeo  $\beta$ -amiloide. O aumento da atividade da enzima TrxR no grupo que foi submetido à administração do A $\beta$ 1-40 e que posteriormente recebeu creatina (0,01 mg/kg) pode ser devido à inibição de GSK-3 $\beta$  e consequente translocação de Nrf2 para o núcleo, como foi mostrado nesse trabalho. Mesmo que a administração do A $\beta$ 1-40 tenha causado um aumento da atividade das enzimas

antioxidantes GR e TrxR, este resultado pode estar relacionado a um efeito compensatório adaptativo na tentativa de minimizar os danos causados pelo A $\beta$ 1-40, de maneira semelhante a PREDIGER *et al.* (2007) e SOUZA *et al.* (2013). A administração aguda de creatina foi capaz de prevenir as alterações na atividade enzimática causadas pelo modelo, bem como o comportamento tipo-depressivo, demonstrando sua ação neste modelo e reforçando a necessidade de estudos mais aprofundados acerca dos mecanismos de ação da creatina como um potencial composto antidepressivo na comorbidade depressão/DA.

## 8. CONCLUSÕES

O tratamento com A $\beta$ 1-40 (400 pmol/animal) apresentou efeito tipo-depressivo no TSC e no TBS, reforçando evidências da literatura do efeito tipo-depressivo causado pelo modelo. Agudamente, tanto a creatina (10 mg/kg) quanto a fluoxetina (10 mg/kg) apresentaram efeito tipo-antidepressivo *per se* no TSC. Após dez dias de injeção com A $\beta$ 1-40, os tratamentos com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) apresentaram efeito tipo-antidepressivo no TSC.

Em relação às análises bioquímicas, os animais tratados com A $\beta$ 1-40 (400 pmol/animal) e posteriormente tratados com creatina na dose de 0,01 mg/kg no décimo dia, demonstraram um aumento na fosforilação de GSK-3 $\beta$  no resíduo se serina 9 e o imunocontéudo hipocampal de HO-1. O grupo tratado com A $\beta$ 1-40 e que recebeu veículo no décimo dia após tratamento não demonstrou aumento no imunocontéudo de fosfo-GSK-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$  e HO-1 e também não foram observadas alterações nos níveis de GSH e a atividade das enzimas GR e TrxR hipocampais. Porém, o grupo pré-tratado com A $\beta$ 1-40 e tratado com creatina 0,01 mg/kg no décimo dia demonstrou um aumento na atividade da enzima TrxR no hipocampo.

Em conjunto os resultados desse trabalho mostram que o administração do peptídeo  $\beta$ -amiloide é uma forma pré-clínica promissora para estudar associados à comorbidade depressão/DA. A creatina tem efeito tipo-antidepressivo nesse modelo, sendo necessários mais estudos pré-clínicos e clínicos para assegurar a eficácia do composto. Contudo, o possível envolvimento da via de sinalização GSK-3 $\beta$ /Nrf2/HO-1 na comorbidade depressão/DA, bem como no efeito da creatina nesse modelo ainda precisa ser melhor elucidado.

## 9. PERSPECTIVAS

- Verificar se as alterações bioquímicas que ocorreram no hipocampo ocorrem no córtex pré-frontal dos animais submetidos ao modelo do peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40 e aos tratamentos com creatina (0,01 e 10 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg).
- Verificar o efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) sub-crônico (7 dias) sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide 1-40.
- Avaliar o efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) por 7 dias sobre o comportamento tipo-depressivo induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide sobre alterações na atividade das enzimas antioxidantes (TrxR e GR) e nos níveis de GSH no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais.
- Avaliar o efeito do tratamento com creatina (0,01 e 10 mg/kg) por 7 dias no modelo induzido por peptídeo  $\beta$ -amiloide sobre alterações no imunocontéudo de p-GSK-3 $\beta$  e HO-1 no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSENOV, M. *et al.* . Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. **J Neurochem**, v. 74, n. 6, p. 2520-7, 2000.

AKSENOV, M. Y. *et al.* . The expression of creatine kinase isoenzymes in neocortex of patients with neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Pick's disease. **Exp Neurol**, v. 146, n. 2, p. 458-65, 1997.

AMITAL, D. *et al.* . Observed effects of creatine monohydrate in a patient with depression and fibromyalgia. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 10, p. 1840-1, 2006.

ASSOCIATION, A. P. **DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL V (DSM-V)** 2013.

AULD, D. S. *et al.* . Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. **Prog Neurobiol**, v. 68, n. 3, p. 209-45, 2002.

BAKER, H. M.; ANDERSON, B. F.; BAKER, E. N. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 7, p. 3579-83, 2003.

BARTUS, R. T.; EMERICH, D. F. Cholinergic markers in Alzheimer disease. **JAMA**, v. 282, n. 23, p. 2208-9, 1999.

BEASLEY, C. M., JR. *et al.* . High-dose fluoxetine: efficacy and activating-sedating effects in agitated and retarded

depression. **J Clin Psychopharmacol**, v. 11, n. 3, p. 166-74, 1991.

BEAULIEU, J. M. *et al.* . Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 4, p. 1333-8, 2008.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BLOOM, D. A.; JAISWAL, A. K. Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 gene expression. **J Biol Chem**, v. 278, n. 45, p. 44675-82, 2003.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3289-303, 2013.

BUDNI, J. *et al.* . Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Exp Neurol**, v. 240, p. 112-21, 2013.

CARACI, F. *et al.* . Depression and Alzheimer's disease: neurobiological links and common pharmacological targets. **Eur J Pharmacol**, v. 626, n. 1, p. 64-71, 2010.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J Biol Chem**, v. 250, n. 14, p. 5475-80, 1975.

CASTREN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 1, p. 58-64, 2004.

CHI, S. *et al.* . Depression in Alzheimer's disease: epidemiology, mechanisms, and management. **J Alzheimers Dis**, v. 42, n. 3, p. 739-55, 2014.

CUNHA, M. P. *et al.* . Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. **Mol Neurobiol**, 2015.

CUNHA, M. P. *et al.* . Protective effect of creatine against 6-hydroxydopamine-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Involvement of intracellular signaling pathways. **Neuroscience**, v. 238, p. 185-94, 2013a.

CUNHA, M. P. *et al.* . The activation of alpha1-adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in the tail suspension test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 44, p. 39-50, 2013b.

CUNHA, M. P. *et al.* . Evidence for the involvement of 5-HT1A receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. **Brain Res Bull**, v. 95, p. 61-9, 2013c.

DOS SANTOS, V. V. *et al.* . Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid-beta (A $\beta$ (1-40)) administration in mice. **Behav Brain Res**, v. 244, p. 107-15, 2013.

DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597-606, 1997.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-27, 2006.

ENGEDAL, K. *et al.* . Depression in Alzheimer's disease: specificity of depressive symptoms using three different clinical criteria. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 26, n. 9, p. 944-51, 2011.

FERREIRA, I. L. *et al.* . Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease. **Curr Drug Targets**, v. 11, n. 10, p. 1193-206, 2010.

FRANCESCHELLI, A. *et al.* . Sex differences in the rapid and the sustained antidepressant-like effects of ketamine in stress-naive and "depressed" mice exposed to chronic mild stress. **Neuroscience**, v. 290, p. 49-60, 2015.

FRANK-CANNON, T. C. *et al.* . Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? **Mol Neurodegener**, v. 4, p. 47, 2009.

FREITAS, A. E. *et al.* . Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. **Behav Brain Res**, v. 237, p. 176-84, 2013.

FRODL, T. *et al.* . Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 7, p. 1112-8, 2002.

GAUTHIER, S. *et al.* . Management of behavioral problems in Alzheimer's disease. **Int Psychogeriatr**, v. 22, n. 3, p. 346-72, 2010.

GHOSAL, K. *et al.* . Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 43, p. 18367-72, 2009.

GOTZ, J. *et al.* . Modes of Abeta toxicity in Alzheimer's disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 20, p. 3359-75, 2011.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 323-54, 2010.

GROSSBERG, G. T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease:: getting on and staying on. **Curr Ther Res Clin Exp**, v. 64, n. 4, p. 216-35, 2003.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-6, 2002.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1558-68, 2011.

HESER, K. *et al.* . Age of major depression onset, depressive symptoms, and risk for subsequent dementia: results of the German study on Ageing, Cognition, and Dementia in Primary Care Patients (AgeCoDe). **Psychol Med**, v. 43, n. 8, p. 1597-610, 2013.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu Rev Biochem**, v. 54, p. 237-71, 1985.

HOLMGREN, A.; BJORNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods Enzymol**, v. 252, p. 199-208, 1995.

HUI, J. *et al.* . Fluoxetine regulates neurogenesis in vitro through modulation of GSK-3 $\beta$ /beta-catenin signaling. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 5, 2015.

JOPE, R. S.; ROH, M. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 11, p. 1421-34, 2006.

KASPAR, J. W.; NITURE, S. K.; JAISWAL, A. K. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 47, n. 9, p. 1304-9, 2009.

KATSUOKA, F. *et al.* . Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. **J Biol Chem**, v. 280, n. 6, p. 4483-90, 2005.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 47, p. 89-116, 2007.

KIM, E. A. *et al.* . Antioxidative effects of ethyl 2-(3-(benzo[d]thiazol-2-yl)ureido)acetate against amyloid beta-induced oxidative cell death via NF-kappaB, GSK-3 $\beta$  and beta-catenin signaling pathways in cultured cortical neurons. **Free Radic Res**, v. 49, n. 4, p. 411-21, 2015.

KIM, H. G. *et al.* . Mori Fructus improves cognitive and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid toxicity through the GSK-3 $\beta$  pathway in vitro and in vivo. **J Ethnopharmacol**, 2015.

KIM, H. J.; KIM, W.; KONG, S. Y. Antidepressants for neuroregeneration: from depression to Alzheimer's disease. **Arch Pharm Res**, v. 36, n. 11, p. 1279-90, 2013.

KONDO, D. G. *et al.* . Open-label adjunctive creatine for female adolescents with SSRI-resistant major depressive disorder: a 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. **J Affect Disord**, v. 135, n. 1-3, p. 354-61, 2011.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

LAFERLA, F. M.; GREEN, K. N.; ODDO, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 7, p. 499-509, 2007.

LAURIJSSENS, B.; AUJARD, F.; RAHMAN, A. Animal models of Alzheimer's disease and drug development. **Drug Discov Today Technol**, v. 10, n. 3, p. e319-27, 2013.

LEDO, J. H. *et al.* . Amyloid-beta oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 10, p. 1053-4, 2013.

LEONARD, B. E. Inflammation, depression and dementia: are they connected? **Neurochem Res**, v. 32, n. 10, p. 1749-56, 2007.

LI, X. *et al.* . In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 8, p. 1426-31, 2004.

LOVELL, M. A. *et al.* . Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 3, p. 418-27, 2000.

LOWRY, O. H. *et al.* . Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

MANGIALASCHE, F. *et al.* . Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Ageing Res Rev**, v. 8, n. 4, p. 285-305, 2009.

MANN, J. J. *et al.* . Attempted suicide characteristics and cerebrospinal fluid amine metabolites in depressed inpatients. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 576-86, 1996.

MANOSSO, L. M. *et al.* . Antidepressant-like effect of alpha-tocopherol in a mouse model of depressive-like behavior induced by TNF-alpha. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 48-57, 2013.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 631-9, 2004.

MAWUENYEGA, K. G. *et al.* . Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. **Science**, v. 330, n. 6012, p. 1774, 2010.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, n. 3, p. 436-52, 2006.

MEDEIROS, R. *et al.* . Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits

induced by amyloid beta protein. **J Neurosci**, v. 27, n. 20, p. 5394-404, 2007.

MONTGOMERY, S. A. *et al.* . Selective serotonin reuptake inhibitors: meta-analysis of discontinuation rates. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 9, n. 1, p. 47-53, 1994.

MORETTI, M. *et al.* . Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **J Mol Neurosci**, v. 49, n. 1, p. 68-79, 2013.

MORETTI, M. *et al.* . Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res**, v. 48, n. 1, p. 16-24, 2014.

MORETTI, M. *et al.* . Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 3, p. 331-40, 2012.

MORILAK, D. A.; FRAZER, A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 2, p. 193-218, 2004.

MOTA, S. I. *et al.* . Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1852, n. 7, p. 1428-41, 2015.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1498-504, 1997.

MUTLU, O. *et al.* . Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. **Life Sci**, v. 91, n. 25-26, p. 1252-62, 2012.

NAGAHARA, A. H. *et al.* . Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. **Nat Med**, v. 15, n. 3, p. 331-7, 2009.

NAGLIE, G. *et al.* . Predictors of patient self-ratings of quality of life in Alzheimer disease: cross-sectional results from the Canadian Alzheimer's Disease Quality of Life Study. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 19, n. 10, p. 881-90, 2011.

NEIS, V. B. *et al.* . Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha is abolished by agmatine administration. **Behav Brain Res**, v. 261, p. 336-44, 2014.

NESTLER, E. J. *et al.* . Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. **J Neurosci**, v. 15, n. 11, p. 7539-47, 1995.

NOTARIANNI, E. Hypercortisolemia and glucocorticoid receptor-signaling insufficiency in Alzheimer's disease initiation and development. **Curr Alzheimer Res**, v. 10, n. 7, p. 714-31, 2013.

OLIN, J. T. *et al.* . Provisional diagnostic criteria for depression of Alzheimer disease. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 10, n. 2, p. 125-8, 2002.

PALOP, J. J.; MUCKE, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 812-8, 2010.

PAMPLONA, F. A. *et al.* . Altered emotionality leads to increased pain tolerance in amyloid beta (Abeta1-40) peptide-treated mice. **Behav Brain Res**, v. 212, n. 1, p. 96-102, 2010.

PARSONS, C. G. *et al.* . Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). **Neuropharmacology**, v. 32, n. 12, p. 1337-50, 1993.

PHIEL, C. J. *et al.* . GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. **Nature**, v. 423, n. 6938, p. 435-9, 2003.

POORTMANS, J. R.; FRANCAUX, M. Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 8, p. 1108-10, 1999.

POPP, J. *et al.* . CSF cortisol in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 3, p. 498-500, 2009.

POSSER, T. *et al.* . Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 6, p. 407-14, 2007.

PREDIGER, R. D. *et al.* . Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res**, v. 177, n. 2, p. 205-13, 2007.

PUZZO, D. *et al.* . Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. **Biochem Pharmacol**, v. 88, n. 4, p. 450-67, 2014.

RODRIGUES, A. L. *et al.* . Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 1347-58, 2002.

RODRIGUES, R.; PETERSEN, R. B.; PERRY, G. Parallels between major depressive disorder and Alzheimer's disease: role of oxidative stress and genetic vulnerability. **Cell Mol Neurobiol**, v. 34, n. 7, p. 925-49, 2014.

ROITMAN, S. *et al.* . Creatine monohydrate in resistant depression: a preliminary study. **Bipolar Disord**, v. 9, n. 7, p. 754-8, 2007.

ROJO, L. E. *et al.* . Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. **Arch Med Res**, v. 39, n. 1, p. 1-16, 2008.

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, n. 4, p. 331-59, 2007.

SAKONO, M.; ZAKO, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. **FEBS J**, v. 277, n. 6, p. 1348-58, 2010.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of

neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63-77, 2012.

SAVITZ, J.; DREVETS, W. C. Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 5, p. 699-771, 2009.

SHAPIRA, M. *et al.* . Role of glycogen synthase kinase-3beta in early depressive behavior induced by mild traumatic brain injury. **Mol Cell Neurosci**, v. 34, n. 4, p. 571-7, 2007.

SKOLNICK, P.; POPIK, P.; TRULLAS, R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 11, p. 563-9, 2009.

SOUZA, L. C. *et al.* . Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by beta-amyloid(1)(-)(4)(0) peptide. **Neurotox Res**, v. 24, n. 2, p. 148-63, 2013.

STERU, L. *et al.* . The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

SU, H. C. *et al.* . Glycogen synthase kinase-3beta regulates anti-inflammatory property of fluoxetine. **Int Immunopharmacol**, v. 14, n. 2, p. 150-6, 2012.

TAKEDA, S. *et al.* . Validation of Abeta1-40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. **Brain Res**, v. 1280, p. 137-47, 2009.

TARIOT, P. N. *et al.* . Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving

donepezil: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 291, n. 3, p. 317-24, 2004.

VALKANOVA, V.; EBMEIER, K. P. Vascular risk factors and depression in later life: a systematic review and meta-analysis. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 5, p. 406-13, 2013.

VALKO, M. *et al.* . Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VERRI, M. *et al.* . Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 25, n. 2, p. 345-53, 2012.

WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. **J Biol Chem**, v. 248, n. 10, p. 3582-92, 1973.

WENK, G. L. *et al.* . No interaction of memantine with acetylcholinesterase inhibitors approved for clinical use. **Life Sci**, v. 66, n. 12, p. 1079-83, 2000.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 343-51, 2001.