

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

# **Estudo do efeito antidepressivo do zinco em camundongos**

Angelo Oscar da Rosa

Florianópolis, 2003.

# **Estudo do efeito antidepressivo do zinco em camundongos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

**Orientadora: Dra Ana Lúcia Severo Rodrigues.**

Florianópolis, 2003.

“Nunca é igual saber a verdade por si mesmo que ter que escutá-la por outro”.

Aldoux Huxley

## **Agradecimentos**

Um agradecimento a CAPES por ter me concedido uma bolsa de estudos para a realização desta dissertação.

Agradeço a professora Yara Raul Müller e a Nivaldo Manoel Vicente pela ajuda em assuntos acadêmicos e pela sua amizade.

Gostaria de agradecer aos professores da pós-graduação em neurociências da UFSC pelos conhecimentos adquiridos e pela amizade que cultivei com muitos deles.

Um agradecimento especial ao professor Adair Roberto S. Santos pelo auxílio em minhas atividades de pesquisa e por ter me ensinado que é possível trabalhar seriamente e com prazer, e o que é melhor, sempre se divertindo muito. E um agradecimento maior ainda pela sua amizade, que considero muito, e pretendo cultivar com muito carinho.

Agradeço aos meus amigos de laboratório pela sua colaboração e grande amizade que cultivamos. Espero poder estar sempre em contato, mesmo quando a distância nos separar.

Gostaria de agradecer ao professor Nelson Horácio Gabilan pela colaboração com o nosso laboratório e em especial pela sua amizade e sua disposição em ajudar-me no direcionamento da minha carreira científica e como consequência na história da minha vida.

Um agradecimento mais que especial a minha orientadora Ana Lúcia Severo Rodrigues. Obrigado por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e ter investido em mim. Obrigado por ter me ensinado a curiosidade e seriedade necessárias ao investigador. Obrigado pela paciência, simplicidade e pelos conhecimentos inestimáveis os quais me proporcionou. E obrigado pela sua amizade, que sempre foi muito agradável.

Serei para sempre grato e disposto a ajudá-la. Como diria o físico Newton: “se consegui enxergar mais longe, é porque me apoiei nos ombros de gigantes”.

Obrigado aos meus velhos amigos pelo apoio e por entender a minha ausência durante o período em que realizei esta dissertação.

Obrigado a minha família por ter me apoiado em todos os momentos. Em especial, agradeço a minha mãe, que além de sua compreensão e apoio, me auxiliou financeiramente durante o período em que não possuía uma bolsa de estudos, e sem o qual a realização desta dissertação não seria possível.

É um agradecimento muito especial a minha esposa e companheira Thais Lourenço Nogueira por sua compreensão pelo tempo em que estive ausente, pelo apoio e estímulo incondicionais e pelas horas agradáveis que me permitiram trabalhar com mais tranquilidade.

# SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>x</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xii</b>
<b>1.Introdução.....</b>	<b>01</b>
1.1.Depressão.....	01
1.2. Sistemas de neurotransmissores e moduladores da depressão.....	04
1.3. Zinco e depressão.....	11
1.4. Modelos animais de depressão.....	13
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
<b>3. Justificativas.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Materiais e métodos.....</b>	<b>16</b>
4.1. Animais.....	16
4.2. Drogas e reagentes.....	16
4.3. Tratamento.....	16
4.4. Testes comportamentais.....	17

4.4.1. Teste do nado forçado (TNF).....	17
4.4.2. Teste da suspensão da cauda (TSC).....	19
4.4.3. Teste do campo aberto (TCA).....	20
4.4.4. Protocolos experimentais.....	21
4.5 Análise estatística.....	28
<b>5. Resultados.....</b>	<b>29</b>
<b>6. Discussão.....</b>	<b>48</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>62</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>63</b>
<b>Apêndice.....</b>	<b>76</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CEUA = Comissão de Ética do Uso de Animais

DMSO = dimetilsulfóxido

DOI = (+)-2,5-dimetoxi-4-iodoamfetamina

ECT = terapia eletroconvulsiva

e.p.m. = erro padrão da média

GLU = glutamato

GMP = guanosina 5' monofosfato

HPA = eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

5-HT = serotonina

5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub> = subtipos de receptores serotoninérgicos

i.c.v. = intracerebroventricular

i.p. = intraperitoneal

ISRN= inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina

ISRS = inibidor seletivo da recaptção de serotonina

L-NNA = N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina

MAO = monoamina oxidase

NMDA = N-metil-D-aspartato

NOS = óxido nítrico sintase

NO = óxido nítrico

PCPA = p-clorofenilalanina metil éster

PKC = proteína quinase C

SNAP = S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SNC = sistema nervoso central

TNF = teste do nado forçado

TSC = teste da suspensão da cauda





## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Teste do nado forçado (TNF).....	18
<b>Figura 2.</b> Teste da suspensão da cauda (TSC).....	19
<b>Figura 3.</b> Teste do campo aberto (TCA).....	20
<b>Figura 4.</b> Efeito da administração aguda de cloreto de zinco no TNF e no TSC.....	30
<b>Figura 5.</b> Efeito da administração intracerebroventricular aguda de cloreto de zinco no TNF.....	31
<b>Figura 6.</b> Efeito do tratamento com cloreto de zinco no número de cruzamento no teste do campo aberto.....	32
<b>Figura 7.</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com ácido ascórbico, ou GMP, na redução do tempo de imobilidade provocada por cloreto de zinco no TNF.....	34
<b>Figura 8.</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina, D-arginina ou SNAP na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco no TNF.....	37
<b>Figura 9.</b> Efeito da administração de uma dose sub-ativa de cloreto de zinco na redução do tempo de imobilidade provocada pelo MK-801, cetamina, L-arginina, N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina, fluoxetina ou imipramina.....	39
<b>Figura 10.</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com prazosim, ou ioimbina, na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco no TNF.	41

<b>Figura 11.</b> Efeito do pré-tratamento dos animais por 4 dias consecutivos com PCPA, na redução do tempo de imobilidade provocada por cloreto de zinco ou fluoxetina no TNF.....	43
<b>Figura 12.</b> Efeito antidepressivo sinérgico do cloreto de zinco com 8-OH-DPAT, pindolol , NAN-190, isamoltane ou fluoxetina no TNF.....	44
<b>Figura 13.</b> Efeito antidepressivo sinérgico do cloreto de zinco com ritanserina, cetanserina ou DOI no TNF.....	45
<b>Figura 14.</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco no TNF.....	46
<b>Figura 15.</b> Efeito do pré-tratamento dos animais com cafeína, na redução do tempo de imobilidade provocada por cloreto de zinco no TNF.....	47

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Esquema de tratamento para estudo do sinergismo entre cloreto de zinco mais MK-801 e cloreto de zinco mais imipramina.....	23
<b>Tabela 2.</b> Efeito do tratamento com cloreto de zinco, MK-801 e imipramina sozinhos ou em combinação no TNF.....	35

## Resumo

O zinco é um metal presente em altas concentrações no sistema nervoso central, mas seu papel fisiológico ainda não é muito bem compreendido. O zinco está diminuído no plasma de indivíduos deprimidos e possui um efeito antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) em ratos e camundongos. Neste estudo o tratamento de camundongos com cloreto de zinco produziu um efeito antidepressivo no TNF na dose de 30 mg/kg intraperitoneal (i.p.) e este efeito foi confirmado nas doses de 10 e 30 mg/kg, i.p. no teste da suspensão da cauda. O efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF também foi observado através da sua administração pela via intracerebroventricular nas doses de 0,05 e 0,1 µg/sítio. O tratamento dos camundongos com cloreto de zinco nas doses de 5 e 30 mg/kg, i.p. diminuiu a locomoção no teste do campo aberto. O efeito antidepressivo do cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF foi prevenido pela administração prévia de GMP (100 mg/kg, i.p.), ácido ascórbico (100 mg/kg, i.p.), L-arginina (750 mg/kg, i.p.), SNAP (25 µg/sítio, i.c.v.), prazosim (62,5 µg/kg, i.p.), ioimbina (1 mg/kg, i.p.), naloxona (1 mg/kg, i.p.), PCPA (100 mg/kg, i.p., por 4 dias consecutivos) e cafeína (3 mg/kg, i.p.), mas não pela D-arginina (750 mg/kg, i.p.). O tratamento dos camundongos com cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) mais imipramina (15 mg/kg, i.p.) produziu um efeito antidepressivo maior que as duas drogas individualmente, mas o tratamento com cloreto de zinco mais MK-801 (0,01 mg/kg, i.p.) não produziu um efeito maior que o do zinco ou do MK-801 isoladamente. O pré-tratamento com uma dose sub-ativa de cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) preveniu o efeito antidepressivo do MK-801 (0,01 mg/kg, i.p.), cetamina (5 mg/kg, i.p.), GMP (50 mg/kg, i.p.), L-arginina (500 mg/kg, i.p.), L-NNA (3 mg/kg, i.p.), mas não o da imipramina (15 mg/kg, i.p.) ou da fluoxetina (32 mg/kg, i.p.). O pré-tratamento dos camundongos com cloreto de zinco numa dose sub-ativa (5 mg/kg, i.p.) foi capaz de potencializar o efeito antidepressivo de doses inativas de pindolol (32 mg/kg, i.p.), DOI (1 mg/kg, i.p.) e fluoxetina (10 mg/kg, i.p.), mas não o do 8-OH-DPAT (1 mg/kg, i.p.), NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.), isamoltane (0,1 mg/kg, i.p.), cetanserina (4 mg/kg, i.p.) ou ritanserina (5 mg/kg, i.p.). Estes resultados sugerem o envolvimento do sistema glutamatérgico (receptores NMDA), da via da L-arginina-óxido nítrico, do sistema serotoninérgico (receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub>), do sistema noradrenérgico (receptores  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2), além dos sistemas opióide e adenosinérgico no efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF. Os resultados sugerem também um sinergismo entre o efeito antidepressivo do zinco e o da fluoxetina e imipramina.

Apoio Financeiro: CAPES e CNPq

## Abstract

Zinc is a metal present at high concentrations in the central nervous system but the physiological roles for zinc are not well established. It has been demonstrated that zinc is present at low blood concentrations in depressed patients and that chronic and acute treatments with zinc produce antidepressant-like effect in rodents in the forced swimming test (FST). Similar results were found in the FST in this study since zinc chloride, at a dose of 30 mg/kg, intraperitoneal (i.p.), significantly decreased the immobility time in this test, and in the dose range of 10-30 mg/kg, i.p., reduced the immobility time in the TST. The administration of zinc chloride by the intracerebroventricular route (0.05 e 0.1 µg/site) also produced a reduction in the immobility time in the FST. Zinc chloride (5-30 mg/kg, i.p.) also caused a significant reduction in the number of crossings in the open-field test. The anti-immobility effect of zinc chloride (30 mg/kg, i.p.) was completely prevented by pre-treatment of animals with ascorbic acid (100 mg/kg, i.p.), GMP (100 mg/kg, i.p.), L-arginine (750 mg/kg, i.p.), SNAP (25 µg/site, i.c.v.), prazosin (62.5 µg/kg, i.p.), yohimbine (1 mg/kg, i.p.), naloxone (1 mg/kg, i.p.), PCPA (100 mg/kg, i.p., for 4 consecutive days) and caffeine (3 mg/kg, i.p.), but not with D-arginine (750 mg/kg, i.p.). The immobility time of mice treated with zinc chloride (30 mg/kg, i.p.) plus MK-801 (0.01 mg/kg, i.p.) was not significantly different from the result obtained with zinc chloride or MK-801 alone; by contrast, zinc chloride plus imipramine (15 mg/kg, i.p.) produced a greater effect in the FST than administration of either drug alone. The pre-treatment with a sub-active dose (5 mg/kg) of zinc chloride completely prevented the anti-immobility effect of MK-801 (0.01 mg/kg, i.p.), ketamine (5 mg/kg, i.p.), GMP (50 mg/kg, i.p.), L-arginine (500 mg/kg, i.p.) or L-NNA (3 mg/kg, i.p.). However, the same treatment with zinc chloride did not alter the anti-immobility effect of fluoxetine (32 mg/kg, i.p.) or imipramine. The pre-treatment with a sub-active dose (5 mg/kg) of zinc chloride significantly enhanced the antidepressant-like effect of sub-effective doses of pindolol (32 mg/kg, i.p.), DOI (1 mg/kg, i.p.) or fluoxetine (10 mg/kg, i.p.), but failed to decrease immobility time when administered in combination with 8-OH-DPAT (1 mg/kg, i.p.), NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.), isamoltane (0,1 mg/kg, i.p.), ketanserin (4 mg/kg, i.p.) or ritanserin (5 mg/kg, i.p.). Taken together, the results demonstrate that zinc's antidepressant-like effects in the FST seem to be mediated by the glutamatergic system (NMDA receptors), L-arginine-nitric oxide pathway, serotonergic system (5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> receptors), noradrenergic system (α<sub>1</sub> e α<sub>2</sub> receptors), opioid and the adenosinergic systems. Furthermore, the potentiation of the antidepressant-like effect of fluoxetine and imipramine by zinc chloride might have potential therapeutic value.

Financial support: CAPES e CNPq

# 1. Introdução

## 1.1. Depressão

Há muito tempo a depressão vem sendo descrita. Desde Hipócrates, por volta do ano 400 antes de Cristo, a depressão já era conhecida como melancolia, e já nestes tempos, os sintomas principais da doença eram reconhecidos, da mesma forma como hoje em dia (Cordás, 2002).

A depressão é um grande problema de saúde pública. É uma doença onipresente e caracterizada por manifestações e sintomas similares em diferentes países, grupos culturais ou status sócio-econômico (Spiegel, 1996).

A média de idade para o diagnóstico de depressão caiu marcadamente nos últimos anos: da faixa de 40 a 50 anos, para 25 a 35 anos de vida (Nemeroff e Owens, 2002). A depressão pode se desenvolver no início da vida e durar até o seu fim, prejudicando as ocupações e papéis sociais dos indivíduos acometidos pela doença e afetando a qualidade de suas vidas (Weissman et al., 1988; Spiegel, 1996). Sua prevalência é alarmante na sociedade atual, com uma estimativa durante o curso da vida de 4,4 a 19,6% (Angst, 1992) e com um índice de suicídio entre os deprimidos de 15% (Musselman et al., 1998). Apesar de sua alta prevalência atual, em serviços de cuidados primários e outros serviços médicos gerais, 30% a 50% dos casos de depressão não são diagnosticados. Este sub-diagnóstico da depressão se deve, entre outros motivos, ao despreparo ou falta de tempo dos médicos não psiquiatras e ao preconceito em relação ao diagnóstico e descrença no tratamento por parte dos pacientes (Fleck et al., 2003).

Os sintomas clínicos da depressão podem ser produzidos por doenças neurológicas, induzidos por doenças clínicas ou drogas (depressão secundária), ou podem ser idiopáticos na

etiologia (depressão primária). A depressão pode ocorrer em um único episódio, ou ser uma doença recorrente (Goodwin e Jamison, 1990). Deste modo, a depressão maior se caracteriza por ser um transtorno heterogêneo, com vários sub-tipos e é improvável que todos os sintomas sejam produzidos por disfunção em uma única área cerebral (Lafer, 1998). Apesar disto, algumas alterações morfológicas têm sido apontadas em regiões específicas do sistema nervoso central (SNC) na depressão, como é o caso do hipocampo, cujo tamanho está reduzido em indivíduos deprimidos quando comparado a hipocampus de indivíduos normais. Também foram relatadas alterações no fluxo sanguíneo e no metabolismo da glicose no lobo frontal e temporal e gânglios da base em indivíduos com depressão (Sheline et al., 1996; Soares e Mann, 1997).

A depressão maior está classificada dentro dos transtornos do humor, que incluem os transtornos unipolares (transtornos depressivos) e transtornos bipolares (doença maníaca depressiva). Os transtornos unipolares caracterizam-se por não apresentarem históricos de episódios maníacos como os transtornos bipolares (American Psychiatric Association, 1994).

Os critérios para o diagnóstico da depressão maior se baseiam em seus sintomas: 1. Humor deprimido a maior parte do tempo, a maioria dos dias; 2. Diminuição marcante no interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades (anedonia); 3. Aumento ou diminuição marcante de peso ou apetite; 4. Insônia ou hipersônia quase todos os dias; 5. Agitação ou retardo psicomotor; 6. Fadiga ou falta de energia quase todos os dias; 7. Sentimentos de culpa ou desvalia excessivos; 8. Diminuição na capacidade de concentração e pensamento; 9. Pensamentos recorrentes de morte, idéias ou tentativas de suicídio e sentimentos de desesperança. Para preencher os critérios de depressão maior o indivíduo deve apresentar: i) um total de cinco sintomas, com duração mínima de duas semanas; ii) um entre os dois primeiros sintomas acima (American Psychiatric Association, 1994).

Além destes sintomas, existem alguns distúrbios intimamente associados à depressão, como os cardiovasculares, cérebro-vasculares, músculo-esqueléticos, metabólicos, pulmonares e sintomas como dores crônicas que estão presentes em aproximadamente 50% dos pacientes com depressão (Von Knorring et al., 1984; Kumar et al., 2002), assim como também distúrbio de ansiedade geral, distúrbio de ansiedade social, distúrbio do pânico, distúrbio obsessivo compulsivo e distúrbio de estresse pós-traumático (Nemeroff e Owens, 2002).

Existe um consenso geral de que a depressão pode resultar da disfunção de vários neurotransmissores ou sistemas metabólicos. A hipótese monoaminérgica sugere que a depressão resulta de uma deficiência de serotonina ou noradrenalina, ou, ainda, de receptores deficientes (Mann et al., 1996; Wong e Licínio, 2001). Vários antidepressivos aumentam a concentração de serotonina ou noradrenalina na fenda sináptica, pois bloqueiam a recaptação de serotonina, noradrenalina ou de ambos os neurotransmissores (Baldessarini, 1996). A transmissão dopaminérgica também tem sido implicada na fisiopatologia da depressão (Rampello et al., 2000). Entre outros sintomas, as síndromes depressivas são caracterizadas pela perda da capacidade de sentir prazer e pela perda da motivação. Os antidepressivos aumentam a transmissão dopaminérgica no sistema mesolímbico, a qual é crucial nos sistemas de motivação e recompensa (D' Aquila et al., 2000).

Mais recentemente os receptores NMDA e a via da L-arginina-óxido nítrico têm sido implicadas na fisiopatologia da depressão. Os indivíduos deprimidos possuem um nível elevado de glutamina plaquetário o que sugere uma alteração no ciclo do glutamato e glutamina (Levine et al., 2000). Possuem ainda um aumento na atividade da enzima arginase, que pode modular a geração de óxido nítrico (NO), e níveis alterados de nitrato no sangue, sugerindo também uma alteração na produção de NO na depressão (Suzuki et al., 2001; Elgün e Kumbasar, 2000).



Um dado consistente a respeito do envolvimento dos receptores NMDA na patologia da depressão vem do fato de que o tratamento com cetamina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA, produz uma melhora no quadro de depressão em humanos (Berman et al., 2000; Kudoh et al., 2002).

## **1.2. Sistema de neurotransmissores e modulação da depressão**

O tratamento para a depressão, com certeza, já mostra uma grande efetividade. Tanto a terapia eletroconvulsiva (ECT), quanto certas psicoterapias e medicamentos antidepressivos têm demonstrado alguma eficácia no tratamento da depressão (Nemeroff e Owens, 2002).

A ECT, apesar de antiga, definitivamente não está ultrapassada. Em depressões graves com risco de suicídio, com características psicóticas e em gestantes, a ECT é uma excelente opção. Atualmente a administração é feita de forma ética com pessoal treinado e ambiente apropriado (Matos e Sousa, 1999). A ECT consiste na passagem de uma corrente elétrica através do cérebro para produzir uma convulsão generalizada no SNC sob anestesia e relaxamento muscular (Iseberg e Zorumski, 2000). Dentre os efeitos conhecidos da ECT, os principais são: aumento da transmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal e estriado juntamente com uma diminuição da sensibilidade dos autoreceptores dopaminérgicos; aumento da transmissão serotoninérgica e aumento do “*binding*” de receptores 5-HT<sub>2</sub> no córtex; bloqueio muscarínico; inibição da potenciação a longo prazo (LTP) induzida por receptores NMDA no hipocampo; dessensibilização β-adrenérgica e aumento do *turnover* de noradrenalina e da sensibilidade do receptor α<sub>1</sub>-adrenérgico (Iseberg e Zorumski, 2000).

Os antidepressivos são drogas usadas para tratar a depressão pelas suas ações benéficas sobre o humor (Nemeroff e Owens, 2002). Podem também ser utilizados para o

tratamento de outros distúrbios como: anorexia nervosa, bulimia, ansiedade, catalepsia, narcolepsia, déficit de atenção, hiperatividade, distúrbio obsessivo compulsivo, distúrbio do pânico, distúrbio do estresse pós-traumático, enurese, enxaqueca, tabagismo, náuseas quimioterápicas, dor crônica, úlcera peptídica, urticária (Matos e Sousa, 1999).

Os antidepressivos podem agir na modulação da depressão inibindo a enzima MAO (monoamina oxidase), ou sobre os sistemas de recaptação das monoaminas (principalmente noradrenalina e serotonina, e em menor intensidade, dopamina) em conjunto, como é o caso dos antidepressivos tricíclicos. Podem ainda ser inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) ou da recaptação de noradrenalina (ISRN) (Nemeroff e Owens, 2002). Contudo a psicoterapia da depressão necessita avançar em três aspectos: i) eficácia: após 6-8 semanas alguns pacientes não respondem de maneira alguma ao tratamento e apenas 35-45% dos indivíduos tratados com as doses usuais dos antidepressivos mais comuns retornam aos níveis pré-mórbidos, sem nenhum sintoma depressivo (Nemeroff e Owens, 2002), embora um número maior (mais que 80%) mostre respostas parciais (Nestler et al., 2002). ii) tolerabilidade: A principal variável relacionada à não adesão ao tratamento antidepressivo são os efeitos colaterais (Sleath et al., 2003; MacGillivray et al., 2003). Os efeitos colaterais mais frequentes, que provavelmente são decorrentes de efeitos anticolinérgicos, são a tontura e sedação, alterações cognitivas e comprometimento sub-clínico da memória. O ganho de peso é induzido principalmente por antidepressivos tricíclicos, inibidores da MAO e lítio. Acredita-se que 5 a 20% dos indivíduos tratados com antidepressivos sofram de hipomania. Existem ainda os efeitos resultantes do bloqueio muscarínico como boca seca, visão turva, constipação e dificuldade de urinar (Matos e Sousa, 1999). Os antidepressivos de última geração, como os ISRS ou ISRN, ao contrário dos tricíclicos e inibidores da MAO, têm a vantagem de que sua “overdose” não é letal, são ainda mais tolerados e não produzem efeitos cardíacos adversos. Entretanto, eles possuem seus próprios efeitos adversos como a disfunção

sexual (Nemeroff e Owens, 2002), dores de cabeça, náuseas e perda de peso (Rudorfer e Potter, 1989). iii) velocidade do tratamento: A resposta aos antidepressivos não costuma ser rápida e ocorre entre a segunda e a quarta semana de tratamento (Fleck et al., 2003). Esta resposta lenta dos antidepressivos atuais faz da ação rápida um atributo desejável aos novos agentes terapêuticos (Nemeroff e Owens, 2002). Desta forma, estudos pré-clínicos com novos antidepressivos ou com moduladores da depressão são importantes.

Além dos inibidores da recaptação de monoaminas e dos inibidores da enzima MAO, existe uma gama muito grande de drogas com um potencial antidepressivo ou potencial para modular os efeitos de antidepressivos, em estudos pré-clínicos ou clínicos.

Antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, como o pindolol, aumentam ou aceleram os efeitos de antidepressivos em estudos pré-clínicos e clínicos (Artigas et al., 2001). A administração prévia de pindolol também foi capaz de aumentar o efeito dos ISRS em ratos, mas não alterou o efeito dos antidepressivos tricíclicos (Redrobe et al., 1996). Por outro lado, Moser e Sanger (1999) sugeriram que os antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> não aumentam ou diminuem o efeito da fluoxetina (ISRS) ou befloxatone (um inibidor da MAO) em ratos.

Estudos pré-clínicos em ratos também demonstram que os agonistas 5-HT<sub>1A</sub> podem ser uma possível alternativa para o tratamento da depressão *per se* (Cervo e Samanin, 1987), além de potencializarem o efeito de antidepressivos tricíclicos e ISRN, mas não da fluoxetina e outros ISRS (Redrobe et al., 1996).

Foi demonstrado por estudos farmacológicos que os antagonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub> são capazes de potencializar, em testes pré-clínicos, o efeito antidepressivo da imipramina (tricíclico) e desipramina (inibidor preferencial da recaptação de noradrenalina), mas não o efeito de ISRS, como a fluoxetina ou citalopram em camundongos (Redrobe e Bourin, 1997). Drogas com ação antagonista sobre receptores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>3</sub> também potencializaram o efeito de ISRS em testes pré-clínicos (Redrobe et al., 1996; Redrobe e Bourin, 1997).

Recentemente, a partir de estudos pré-clínicos e clínicos tem sido sugerido que compostos que reduzem a transmissão nos receptores NMDA são antidepressivos, e que o tratamento com antidepressivos pode, por sua vez, ter um impacto sobre a função dos receptores NMDA (Skolnick, 1999, 2002; Petrie, 2000). Também foi demonstrado que inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) exercem efeitos antidepressivos em modelos animais de depressão (Harkin et al., 1999, 2003; Yildiz et al., 2000; Da Silva et al., 2000; Volke et al., 2003). Além disso, o tratamento com inibidores da NOS aumenta a liberação de serotonina no córtex frontal de ratos (Smith e Witton, 2000) e a serotonina endógena parece ser importante para o efeito antidepressivo de inibidores da NOS, como o 7-nitroindazol (Harkin et al., 2003). Também foi demonstrado em estudos *in vitro* que o tratamento com antidepressivos como citalopram, paroxetina e imipramina diminui a atividade da NOS em hipocampo (Wegener et al., 2003). Além disso, o tratamento com inibidores da guanilato ciclase solúvel, enzima que é ativada pelo NO, produz efeito antidepressivo em modelos animais (Eroglu e Caglayan, 1997; Heiberg et al., 2002). Porém, o envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico na depressão está longe de ser assim tão simples, uma vez que o tratamento com a L-arginina, um precursor do NO (substrato da NOS), também produziu um efeito antidepressivo em modelos de depressão em camundongos, sugerindo que o NO pode ser um modulador dual da depressão (Da Silva et al., 2000).

Os opióides endógenos também têm sido implicados nos transtornos depressivos, tendo em vista que foi encontrado um aumento no número de receptores opióides no SNC de vítimas de suicídios com depressão (Gabilondo et al., 1995). Além disso, os antidepressivos são conhecidos por influenciar a liberação de peptídeos opióides, tais como as  $\beta$ -endorfinas (Sawynok et al., 2001) e foi demonstrado níveis altos de opióides endógenos e de seus receptores em áreas límbicas envolvidas na regulação do humor (Waksman et al., 1986). Desta forma, o efeito terapêutico de alguns antidepressivos, principalmente na depressão

severa, poderia estar relacionado com a regulação do sistema opióide (Schreiber et al., 2002). Em um estudo em camundongos foi demonstrado que a naloxona (um antagonista não seletivo de receptores opióides) é capaz de reverter o efeito antidepressivo do extrato hidroalcoólico de *Siphocampylus verticillatus* no teste da suspensão da cauda (Rodrigues et al., 2002). Outro estudo mais recente mostrou que o antagonista de receptores kappa-opióides nor-binaltorfimina produz um efeito antidepressivo no teste do nado forçado em ratos (Mague et al., 2003).

O sistema noradrenérgico está envolvido em muitos processos fisiológicos e psicológicos, incluindo a modulação do humor (Schramm et al., 2001). Vários estudos têm demonstrado alterações na transmissão noradrenérgica na depressão (Charney, 1998; Wong e Licinio, 2001). Deste modo, a noradrenalina tem um papel importante na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de drogas antidepressivas (Charney, 1998; Ressler e Nemeroff, 1999, 2000). O antagonismo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos participa da ação de compostos com ação antidepressiva, como no caso da mirtazipina, aumentando a liberação noradrenérgica e serotonérgica através de ação em auto-receptores ou hetero-receptores (Gupta et al., 2003). Além disto, os antagonistas de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos possuem um maior efeito em deprimidos que em indivíduos normais, aumentando a atividade do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA). A ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pós-sinápticos normalmente inibe o eixo HPA, sugerindo uma hiper-sensibilidade destes receptores em indivíduos com depressão (Price et al., 1986). Os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos também podem estar envolvidos no efeito de antidepressivos uma vez que: i) O antagonista prazosim reverte o efeito antidepressivo de drogas, tais como o extrato de *Siphocampylus verticillatus* no TNF em camundongos (Rodrigues et al., 2002). ii) A administração crônica de mirtazipina (inibidor dual da recaptção de NA e 5-HT) aumenta a responsividade comportamental (locomção e agressividade) e bioquímica dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Rogoz et al.,

2002). iii) A reboxetina (ISRN sem nenhuma afinidade por receptores de neurotransmissores) administrada cronicamente também aumenta a responsividade comportamental (locomoção e agressividade) dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Rogoz e Kolasiewicz, 2001).

Alguns estudos têm proposto que uma função dopaminérgica reduzida está implicada na fisiopatologia da depressão (Rampello et al., 2000; D'Aquila et al., 2000). Baldessarini (1996) descreve que diferentes compostos que afetam diretamente os níveis de dopamina ou receptores dopaminérgicos apresentam atividade antidepressiva. O tratamento com os antidepressivos aumenta a liberação de dopamina em várias áreas do encéfalo (Tanda et al., 1994, 1996; D'Aquila et al., 2000) e aumenta a transmissão dopaminérgica principalmente no sistema mesolímbico, induzindo uma melhora nos sintomas da depressão, tal como a anedonia (Rampello et al., 2000; D'Aquila et al., 2000). Portanto o efeito de antidepressivos sobre a transmissão dopaminérgica parece ter um papel importante no seu efeito terapêutico. Em um recente estudo, foi sugerido que a imobilidade no TNF está associada à neurotransmissão dopaminérgica no córtex pré-frontal medial (Espejo e Minãno, 1999).

A adenosina é um outro provável modulador da depressão, uma vez que existem trabalhos sugerindo que ela produz um efeito depressogênico e que antagonistas de receptores  $A_{2A}$  são dotados de ação antidepressiva (Minor et al., 1994; El Yacoubi et al., 2001). Recentemente também foi demonstrado que a função do receptor  $A_{2A}$  está comprometida em plaquetas de pacientes com depressão maior (Berk et al., 2001), o que sugere o envolvimento da adenosina na depressão. O nosso grupo mostrou que a adenosina, assim como os agonistas de receptores  $A_1$  e  $A_2$  produzem ação antidepressiva no TNF em camundongos (Kaster et al., 2003).

Ainda é sugerido na literatura que antagonistas da substância P (Maubach et al., 1999) e antagonistas de receptores do fator liberador de corticotrofina (CRF) são alvos para um possível efeito antidepressivo (Nemeroff e Owens, 2002).

As vias de sinalização intracelular da proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA) e proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK-II) também têm sido implicadas na ação de antidepressivos. O tratamento com vários antidepressivos altera a translocação destas proteínas reguladas por segundos mensageiros, provocando uma alteração no nível de fosforilação de seus substratos em compartimentos celulares diferentes (Popoli et al., 2000).

Por último, tem se sugerido que as vias de sinalização celular envolvendo a sobrevivência e morte celular estão envolvidas nas ações dos antidepressivos, incluindo a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a proteína antiapoptótica Bcl-2 e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), o que poderia explicar o retardo no efeito dos antidepressivos de 6 a 8 semanas (Manji et al., 2001). De fato, medicamentos com diferentes mecanismos de ação utilizados para o tratamento da depressão como a fluoxetina (Sanchez et al., 2001), cetamina (Engelhard et al., 2003; Proescholdt et al., 2001), valproato (Mora et al., 1999) e o lítio (Chuang et al., 2002) possuem propriedades neuroprotetoras, influenciando no processo de morte neuronal. Várias drogas com ação antidepressiva em modelos animais (Cervo e Samanin, 1987; Eckeli et al., 2000; Krocicka et al., 2001; Zomkowski et al., 2002; Harkin et al., 2003) também possuem um efeito neuroprotetor, como a agmatina (Olmos et al., 1999), o GMP (Malcon et al., 1997), o zinco (Dominguez et al., 2003), o 7-nitroindazol (Castagnoli et al., 1999) e o 8-OH-DPAT (Melena et al., 2000).

### **1.3. Zinco e depressão**

O zinco é um metal de transição essencial aos seres humanos, sendo seu consumo necessário na dieta. Mais de 300 enzimas necessitam deste metal para exercer suas funções, pois ele pode ter uma função catalítica, co-ativa (ou co-catalítica) ou estrutural. Ele é essencial para a replicação e transcrição do DNA e, por isso, influencia poderosamente na divisão e diferenciação celular. A privação de zinco está relacionada a déficits cognitivos em tarefas de atenção visual e memória de curto prazo em macacos, bem como deficiências de aprendizagem e discriminação visual em ratos (Takeda, 2000).

O zinco está presente em altas concentrações no SNC, particularmente nas fibras musgosas do hipocampo (Choi e Koh, 1998; Barañano et al., 2001). Aproximadamente 90% do zinco no encéfalo está presente junto às metaloproteínas (Takeda, 2000), porém este metal também é estocado em vesículas sinápticas e liberado nas terminações nervosas centrais, mediante despolarização (Choi e Koh, 1998; Barañano et al., 2001). Ele produz uma grande variedade de efeitos neuromodulatórios, sendo a inibição do receptor glutamatérgico NMDA um de seus efeitos mais proeminentes (Choi e Koh, 1998). Ele inibe os receptores NMDA por um mecanismo voltagem-dependente similar ao do magnésio, e por meio de um mecanismo independente de voltagem em um sítio distinto (Christine e Choi, 1990). Tem sido demonstrado também que o zinco inibe a NOS constitutiva do encéfalo (Mittal et al., 1995). Após ser liberado, o zinco é captado, pré e pós-sinápticamente (Howell et al., 1984) usando canais iônicos (Koh e Choi, 1994) ou transportadores protéicos específicos (Palmiter et al., 1996) e eventualmente recarregados em vesículas sinápticas (Wenzel et al., 1997). Dentro das células 30 a 40% do zinco está localizado no núcleo, 50% no citosol e organelas citoplasmáticas e o restante está associado a proteínas de membrana. O zinco interfere de acordo com a sua concentração de forma dual na função da proteína quinase-2 dependente de cálcio/calmodulina (CaMK-II), enquanto níveis baixos do metal ativam a enzima de forma



independente de  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina e inibem a ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina à enzima, altos níveis de zinco inibem a função CaMK-II (Lengyel et al., 2000). O zinco pode interferir com os segundos mensageiros AMPc e GMPc, uma vez que parece ser essencial que o zinco esteja em baixas concentrações para que ocorra a atividade das fosfodiesterases (PDE) e que altas concentrações de zinco inibem a ação das PDE. O zinco em concentrações tóxicas produz também ativação das MAPKs do tipo ERK em células corticais de camundongos, e em células epiteliais dos brônquios de humanos, níveis sub-tóxicos de zinco provocam ativação das ERK, JNK e p38, bem como um aumento na fosforilação dos fatores de transcrição Jun e ATF-2, os quais são substratos para as MAPKs. O zinco pode também regular a atividade da PKC. Concentrações nanomolares de zinco podem ativar a PKC e causar a translocação da enzima para a membrana plasmática, um evento central na ativação da PKC. O zinco pode ainda estimular a atividade autônoma da PKC, ou seja, aquela que ocorre na ausência de cofatores ativadores (Beyersmann e Haase, 2001).

O zinco tem uma atuação marcante na regulação da morte celular no sistema nervoso. Alguns estudos revelam um papel neurotóxico do zinco quando em níveis elevados (Park e Koh, 1999; Horning et al., 2000) e a sua implicação em doenças como o Alzheimer (Bush, 2003). Porém também tem sido demonstrado um papel protetor para o zinco em relação à morte neuronal, ao menos em concentrações fisiológicas. O zinco parece proteger os neurônios durante períodos de alta atividade, suportando a teoria de que a liberação sináptica de zinco, inibindo os receptores NMDA, regula a neurotoxicidade provocada por glutamato (Dominguez et al., 2003).

Estudos recentes demonstraram que o tratamento agudo e crônico com zinco produz um efeito antidepressivo em roedores no TNF (Krocza et al., 2000, 2001; Nowak et al., 2003b) e no modelo da bulbectomia em ratos (Nowak et al., 2003b). Entretanto, estes estudos não elucidaram os mecanismos envolvendo este efeito antidepressivo do zinco. O papel do

zinco na modulação da depressão também foi sugerido em alguns estudos clínicos. Foi demonstrado que o zinco está presente em baixas concentrações no plasma de pacientes deprimidos (Maes et al., 1994, 1997, 1999). Demonstrou-se ainda que o tratamento crônico com imipramina, citalopram ou choque eletro-convulsivo induziu uma elevação nas concentrações hipocámpais e séricas de zinco em ratos (Nowak e Schlegel-Zawadzka, 1999). Além disso, foi relatado que o nível de zinco plasmático em indivíduos após a recuperação da depressão está aumentado em relação a pacientes deprimidos (MacLoughlin e Hodge, 1990; Narang et al., 1991) e que existe uma diminuição na capacidade do zinco em inibir o “*binding*” de [<sup>3</sup>H]MK-801 no córtex e hipocampo de vítimas de suicídio (Nowak et al., 2003a). Desta forma, estes resultados sugerem um papel significativo para o zinco na modulação da depressão.

#### **1.4. Modelos animais de depressão**

Vários paradigmas têm sido desenvolvidos e são instrumentos importantes na detecção de novos compostos com ação antidepressiva em estudos pré-clínicos. Dois testes em particular são muito úteis pela facilidade do uso, reprodutibilidade dos resultados e por serem sensíveis ao tratamento agudo com antidepressivos (Cryan et al., 2002): i) O teste do nado forçado (TNF), descrito por Porsolt et al. (1977) e ii) O teste da suspensão da cauda (TSC), um derivado do TNF desenvolvido por Steru et al. (1985).

O TNF e o TSC se baseiam no fato de que os animais submetidos ao estresse lutam inicialmente com movimentos orientados para a fuga, seguidos de períodos de postura imóvel, quando colocados em um cilindro inescapável ou quando os animais são suspensos pela cauda (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar o mecanismo de ação antidepressiva do zinco em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Verificar o efeito antidepressivo do cloreto de zinco administrado intraperitonealmente sobre o teste do nado forçado e o teste da suspensão da cauda em camundongos.
- Investigar o efeito da administração do cloreto de zinco por via intracerebroventricular sobre o teste do nado forçado.
- Investigar o envolvimento dos sistemas glutamatérgico, adrenérgico, serotoninérgico, opióide, adenosinérgico e a via L-arginina-óxido nítrico na ação do cloreto de zinco no teste do nado forçado.
- Investigar um possível efeito modulatório do cloreto de zinco sobre o efeito antidepressivo de antagonistas NMDA, de moduladores da via da L-arginina-óxido nítrico e de antidepressivos convencionais (ISRS e tricíclicos).

### **3. Justificativa**

Considerando que: i) o tratamento agudo com zinco produz um efeito antidepressivo em roedores no teste do nado forçado (Krocicka et al., 2000, 2001); ii) que o tratamento crônico com imipramina, citalopram ou choque eletro-convulsivo induz a uma elevação na concentração de zinco plasmático e hipocampal de ratos (Nowak e Schlegel-Zawadzka, 1999); e iii) que o nível de zinco plasmático em pacientes após a recuperação da depressão está mais elevado em relação à fase anterior ao tratamento (McLoughlin e Hodge, 1990; Narang et al., 1991), este trabalho tem o objetivo de verificar o efeito antidepressivo do zinco em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva e estudar os possíveis mecanismos de ação implicados neste efeito.

## **4. Materiais e métodos**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* de ambos os sexos, pesando 30-40g (60-80 dias de idade), mantidos a 22-27°C com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00-19:00h). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 2 h antes da realização dos experimentos.

Todas as manipulações foram feitas entre as 8:00 e 17:00 h, sendo cada animal utilizado somente uma vez. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

### **4.2 Drogas e reagentes**

Foram utilizados: cloreto de zinco (Merck), ácido ascórbico, cafeína, fluoxetina, guanosina5' monofosfato (GMP), cetamina, imipramina, iombina, L-arginina, metisergida, naloxona, p-clorofeilalanina metil ester (PCPA), pindolol, prazosim, cetanserina, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), 8-OH-DPAT, NAN-190, ritanserina e DOI (Sigma); isamoltane (Tocris), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA) e MK-801 (RBI).

### **4.3 Tratamento**

As drogas utilizadas foram diluídas em solução salina (0,9% NaCl) com exceção do pindolol, NAN-190 e ritanserina, os quais foram diluídos em salina com 1% de Tween 80. As drogas foram administradas pela via intraperitoneal (i.p.) em volume de 10 ml/kg de peso

corporal. O cloreto de zinco foi administrado 30 min antes do TNF, do TSC ou do teste do campo aberto (TCA). O cloreto de zinco também foi administrado em uma outra série de experimentos por via intracerebroventricular (i.c.v.), 15 min antes do teste TNF. A administração via i.c.v. foi realizada como descrito por Eckeli et al. (2000). Os camundongos foram levemente anestesiados com éter. As injeções foram feitas através da inserção de uma agulha conectada por uma cânula de propileno à micro-seringa Hamilton de 10 µl, diretamente no terceiro ventrículo usando-se a bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). A solução salina, SNAP ou cloreto de zinco foram administrados em volume constante de 5 µl durante 30 segundos, e a cânula foi mantida no local da injeção por mais 30 segundos.

## **4.4. Testes comportamentais**

### **4.4.1. Teste do nado forçado (TNF)**

Este modelo foi proposto por Porsolt et al. (1977) para o estudo de substâncias com possível ação antidepressiva. O modelo se baseia na observação de que ratos e camundongos quando forçados ao nado numa situação da qual eles poderiam escapar, após um período inicial de agitação, adotam uma postura de imobilidade (Porsolt et al., 1977). Um camundongo é considerado imóvel quando ele flutua ou faz movimentos necessários apenas para manter sua cabeça acima da água (ver Figura 1).

O tempo de imobilidade dos camundongos foi avaliado durante um período de 6 minutos em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água a temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (Eckeli et al., 2000; Da Silva et al., 2000, Zomkowski et al., 2002). Os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade nesse teste (Porsolt et al., 1977).



**Figura 1.** Teste do nado forçado (TNF).

#### **4.4.2. Teste da suspensão da cauda (TSC)**

O tempo total de imobilidade induzida pela suspensão da cauda foi medido de acordo com o método de Steru et al. (1985). Os camundongos isolados visualmente e acusticamente foram suspensos 50 cm acima do chão com uma fita adesiva colocada aproximadamente a 1 cm da ponta da cauda. O tempo de imobilidade foi registrado durante 6 minutos (Eckeli et al., 2000; Zomkowski et al., 2002; Mantovani et al., 2003). Os antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade dos animais neste teste (ver figura 2).



**Figura 2.** Teste da suspensão da cauda (TSC).



### 4.4.3. Teste do campo aberto

A locomoção dos animais foi medida em um teste do campo aberto como descrito previamente (Rodrigues et al., 1996). A aparato consiste uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O chão da arena é dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados atravessados com todas as patas (cruzamento) foi contado em uma sessão que teve a duração de 6 minutos.

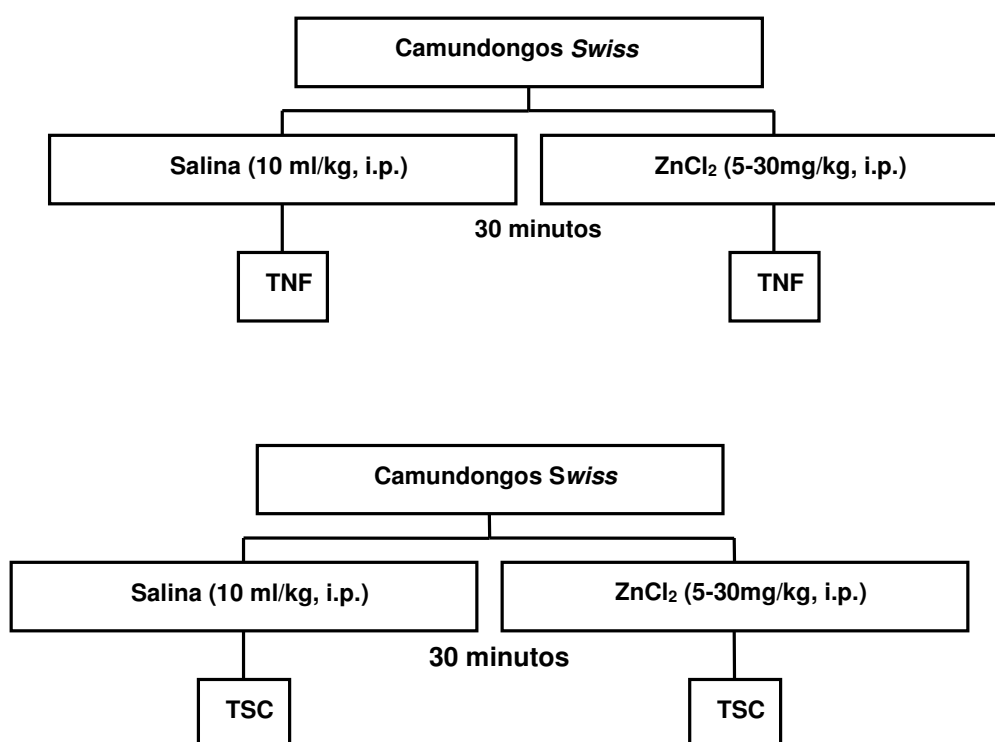


**Figura 3.** Teste do campo aberto (TCA)

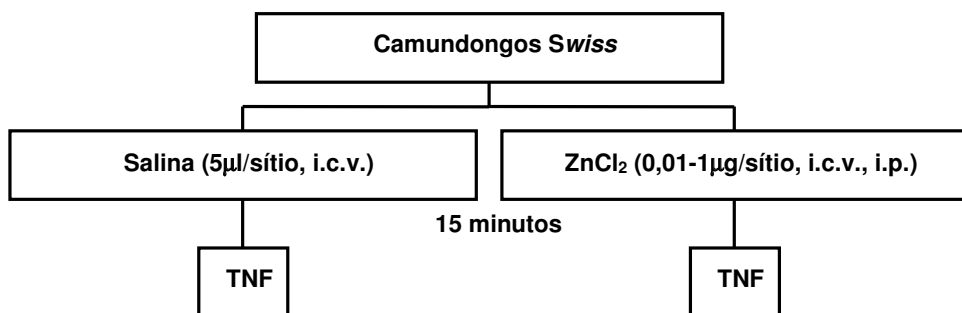
#### 4.4.4. Protocolos experimentais

##### 4.4.4.1. Curva de dose-resposta do cloreto de zinco

Com a finalidade de investigar o efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF e no TSC, os animais receberam injeções de salina (grupo controle) ou de cloreto de zinco (5-30 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF ou TSC.



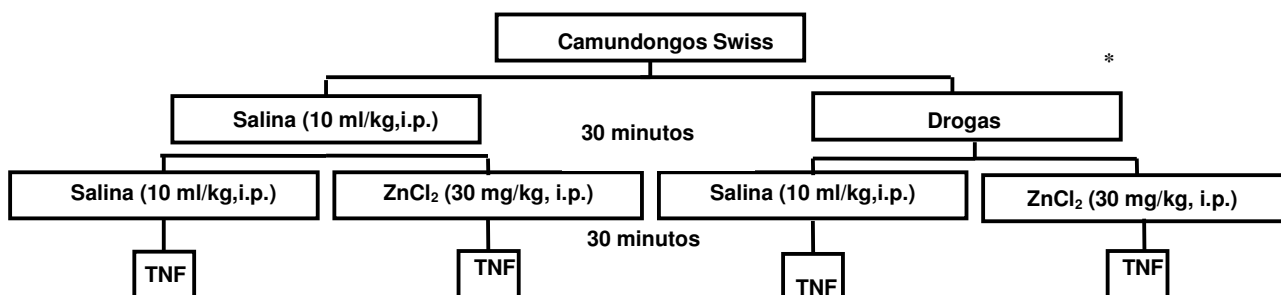
Alternativamente, para verificar se a administração intracerebroventricular de cloreto de zinco produz um efeito antidepressivo, os animais receberão injeções de salina (controle) ou de cloreto de zinco (0,01µg - 1µg/sítio). Decorridos 15 min, os animais foram submetidos ao TNF.



#### 4.4.4.2. Análise do mecanismo de ação antidepressiva do cloreto de zinco através de estudos farmacológicos *in vivo*.

##### *Sistema glutamatérgico*

Para verificar o possível envolvimento dos receptores NMDA na ação do cloreto de zinco no TNF, os camundongos foram pré-tratados com GMP (100 mg/kg, i.p., nucleotídeo que antagoniza algumas ações produzidas por NMDA), ou ácido ascórbico (100 mg/kg, i.p., neuromodulador que age como antagonista de receptores NMDA) ou com salina. Após 30 minutos os animais receberam o cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) e foram testados no TNF, 30 minutos após esta última injeção (Zomkowski et al., 2002; Mantovani et al., 2003).



\* GMP (100 mg/kg, i.p.) ou ácido ascórbico (100 mg/kg, i.p.)

Para verificar um possível efeito somatório do cloreto de zinco/ MK-801 (antagonista não competitivo de receptores NMDA), imipramina (antidepressivo tricíclico)/MK-801, ou cloreto de zinco/imipramina no tempo de imobilidade no TNF, os animais receberam injeções contra-laterais via i.p. de salina/salina, imipramina/salina, cloreto de zinco/salina, salina/MK-801, cloreto de zinco/MK-801, imipramina/MK-801 ou cloreto de zinco/imipramina. O MK-801 foi injetado 15 minutos antes, enquanto as demais drogas foram injetadas 30 minutos antes de os animais serem testados no TNF (Eckeli et al., 2000; Zomkowski et al., 2002). Ver tabela 1.

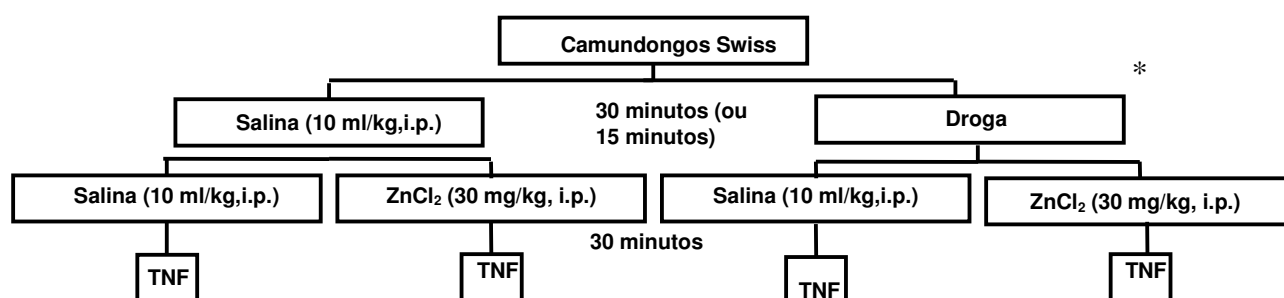
**Tabela 1.** Esquema de tratamento para estudo do sinergismo entre cloreto de zinco mais MK-801 e cloreto de zinco mais imipramina.

Tratamento	Dose (mg/kg, i.p.)
Salina / salina	- / -
Salina / MK-801	- / 0,01
Imipramina / salina	15 / -
Cloreto de zinco / salina	30 / -
Cloreto de zinco / MK-801	30 / 0,01
Cloreto de zinco /imipramina	30 / 15
Imipramina / MK-801	15 / 0,01

### ***Via L-arginina-óxido nítrico***

Para investigar a participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF, os camundongos foram pré-tratados com L-arginina, um precursor do óxido nítrico (NO) (750 mg/kg, i.p.), e após 30 min os animais receberam

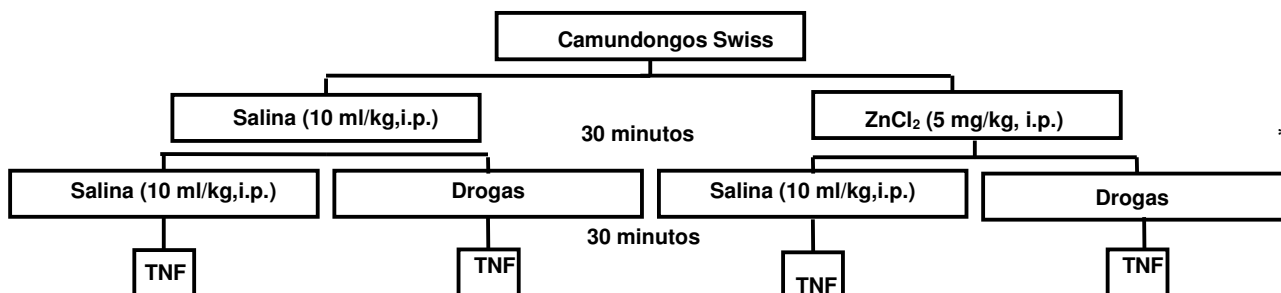
cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 min os animais foram submetidos ao TNF. Com a mesma finalidade os animais foram pré-tratados com S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP; 25 µg/sítio, i.c.v., doadora de NO) ou salina. Decorridos 15 min, os animais receberam cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) ou salina e 30 min depois foram testados no TNF (Rodrigues et al., 2002; Zomkowski et al., 2002; Mantovani et al., 2003).



\*L-arginina (750 mg/kg, i.p.) ou SNAP (25 µg/sítio, i.c.v.)

### ***Modulação exercida pelo cloreto de zinco sobre a ação de antidepressivos no TNF***

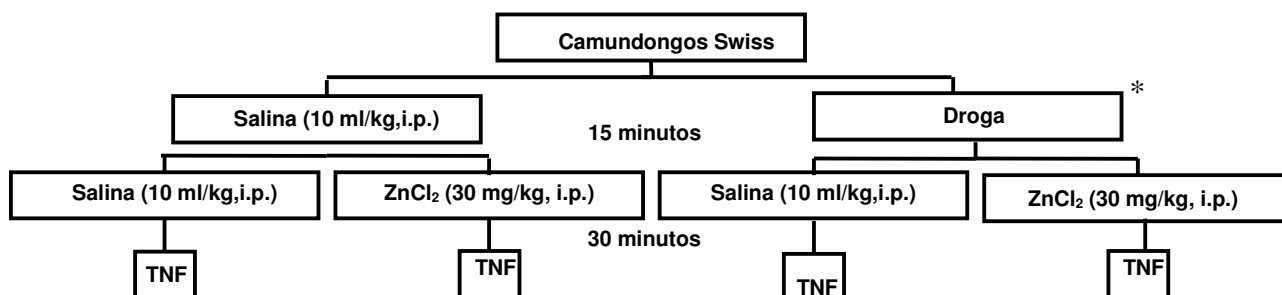
Uma dose sub-ativa de cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) foi administrada 30 min antes da administração intraperitoneal de doses ativas de cetamina (5 mg/kg, antagonista não competitivo de receptores NMDA), MK-801 (0,01 mg/kg), GMP (50 mg/kg), L-arginina (500 mg/kg), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA, 3 mg/kg, inibidora da NOS), imipramina (15 mg/kg) ou fluoxetina (32 mg/kg, ISRS), a fim de investigar uma possível modulação do cloreto de zinco sobre a ação antidepressiva destes compostos. Um intervalo de 30 min foi dado antes de os animais serem submetidos ao TNF.



\*Drogas: cetamina (5 mg/kg), MK-801 (0,01 mg/kg, i.p.), GMP (50 mg/kg, i.p.), L-arginina (500 mg/kg, i.p.), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NNA, 3 mg/kg, i.p.), imipramina (15 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (32 mg/kg, i.p.).

### *Sistema adrenérgico*

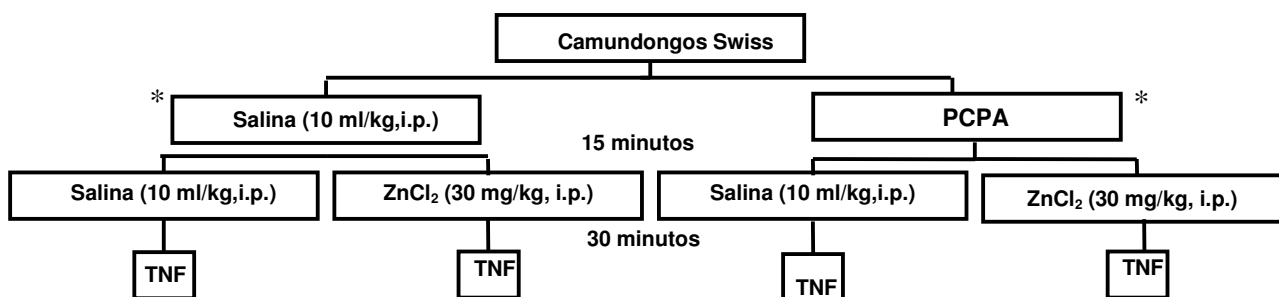
Com o objetivo de estudar o envolvimento do sistema adrenérgico no efeito antidepressivo do cloreto de zinco, os animais foram pré-tratados com salina, prazosim (62,5 µg/kg, i.p., antagonista α<sub>1</sub>-adrenérgico), ou ioimbina (1 mg/kg, i.p., antagonista α<sub>2</sub>-adrenérgico) e depois de 15 min os animais receberam injeções de salina ou cloreto de zinco. Depois de 30 minutos os animais foram submetidos ao TNF (Zomkowski et al., 2002).



\*Prazosim (62,5 µg/kg, i.p.) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p.)

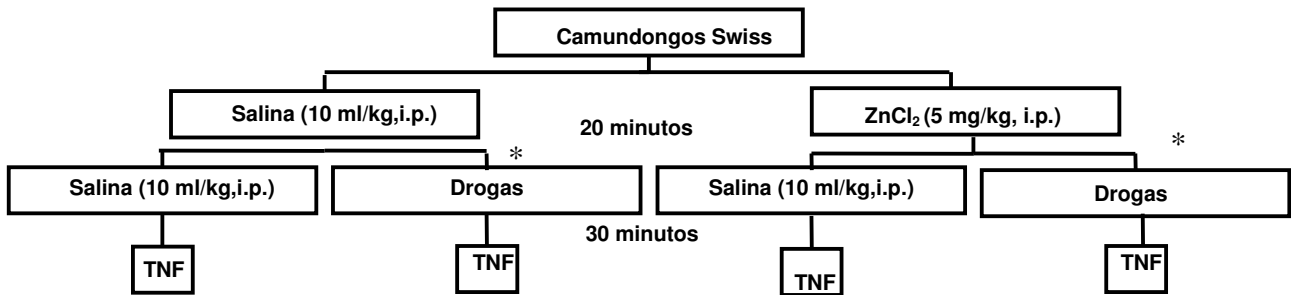
### *Sistema serotoninérgico*

Para investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do cloreto de zinco os animais foram pré-tratados com o inibidor da síntese de serotonina, p-clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., uma vez por dia por 4 dias consecutivos), conforme descrito anteriormente (Eckeli et al., 2000; Rodrigues et al., 2002). Quinze minutos após a última injeção de PCPA, foi realizado o tratamento dos animais com cloreto de zinco, fluoxetina (32 mg/kg, i.p., controle positivo) ou salina e os animais foram submetidos ao TNF após 30 minutos.



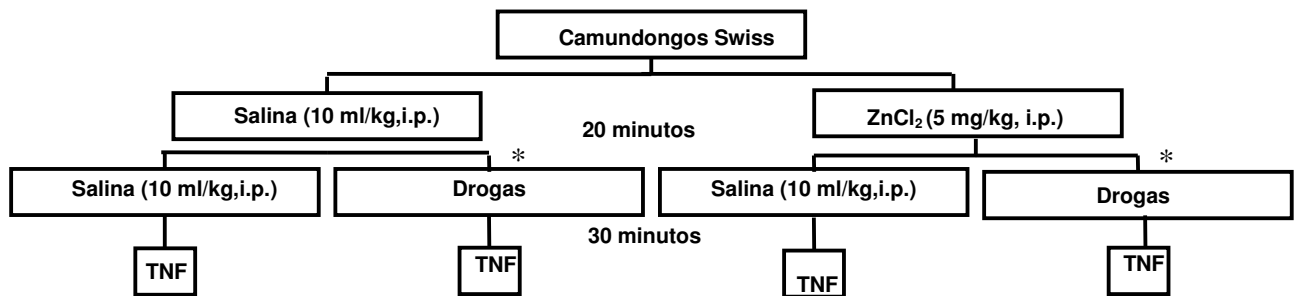
\*Salina e PCPA (100 mg/kg, i.p.) injetado por 4 dias consecutivos

Com o objetivo de investigar o envolvimento dos receptores serotoninérgicos no efeito antidepressivo do cloreto de zinco, os animais foram pré-tratados com uma dose sub-ativa de cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes de doses inativas de 8-OH-DPAT (1 mg/kg, i.p., agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>), pindolol (32 mg/kg i.p., bloqueador  $\beta$ -adrenérgico com atividade antagonista 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>1B</sub>), NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., antagonista 5-HT<sub>1A</sub>), isamoltane (0,1 mg/kg, i.p., antagonista 5-HT<sub>1B</sub>), ou fluoxetina (10 mg/kg, i.p.).



\*8-OH-DPAT (1 mg/kg, i.p.), pindolol (32 mg/kg i.p.), NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.), isamoltane (0,1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, i.p.)

Em um outro experimento, o cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) foi administrado 20 minutos antes de doses inativas de cetanserina (5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>), ritanserina (4 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>) ou DOI (1 mg/kg, i.p., agonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>), com a finalidade de estudar o envolvimento dos receptores 5-HT<sub>2</sub> no efeito antidepressivo do zinco.

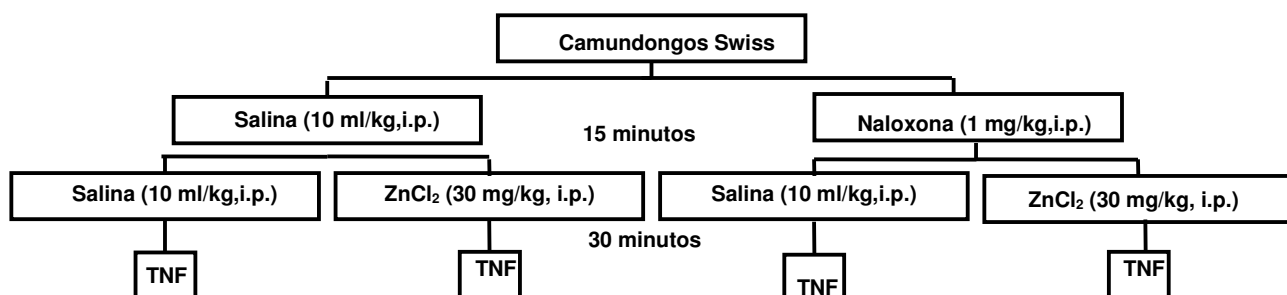


\* cetanserina (5 mg/kg, i.p.), ritanserina (4 mg/kg, i.p.), DOI (1 mg/kg, i.p.)

### ***Sistema opióide***

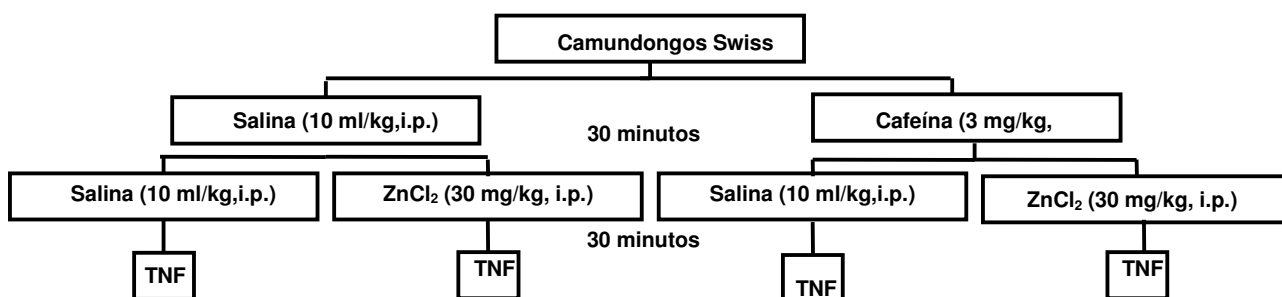
Para verificar o envolvimento do sistema opióide na atividade antidepressiva do cloreto de zinco, os animais foram pré-tratados com salina ou naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo dos receptores opióides). Depois de 15 min os animais receberam injeção de cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 minutos os animais foram avaliados no TNF (Rodrigues et al., 2002).





### *Sistema adenosinérgico*

Com a finalidade de verificar o envolvimento do sistema adenosinérgico na atividade antidepressiva do cloreto de zinco, os animais foram pré-tratados com salina ou cafeína (3 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo dos receptores de adenosina). Depois de 30 minutos os animais receberam injeção de cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) ou salina. Decorridos 30 minutos os animais foram avaliados no TNF.



### **4.5. Análise estatística**

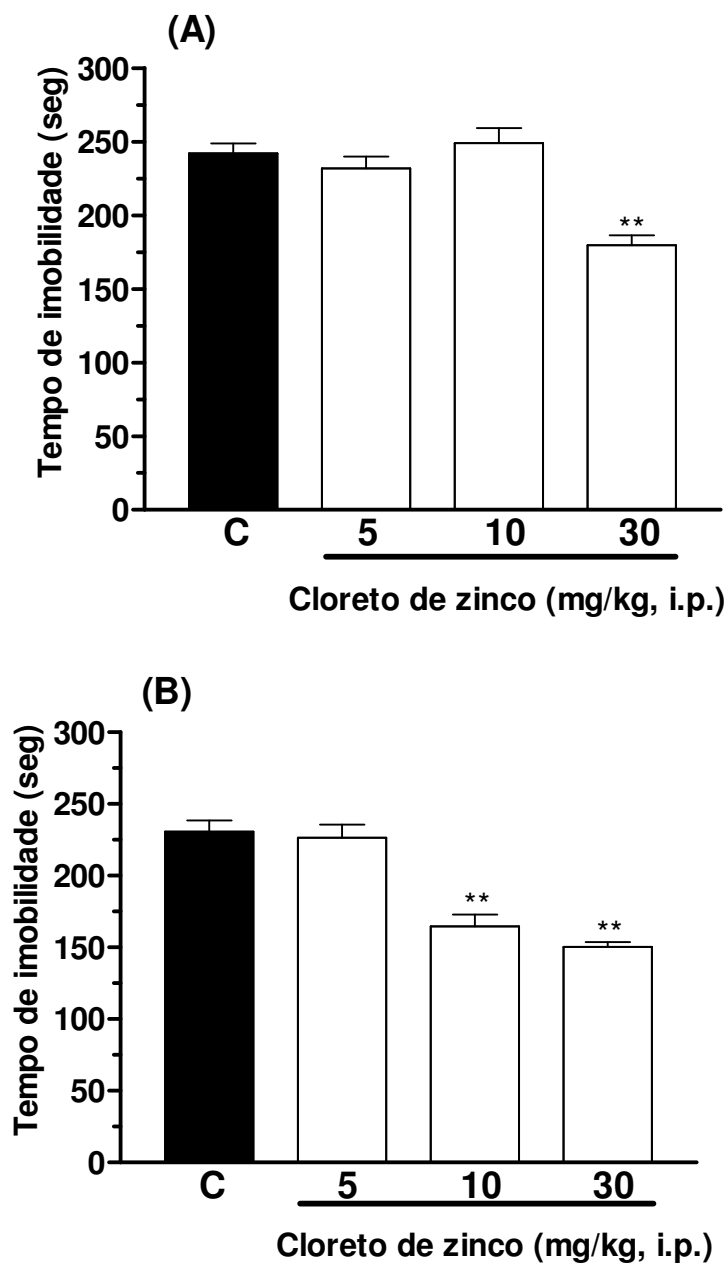
As comparações entre os grupos tratados e o controle foram feitas usando análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Duncan quando apropriado. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## 5. Resultados

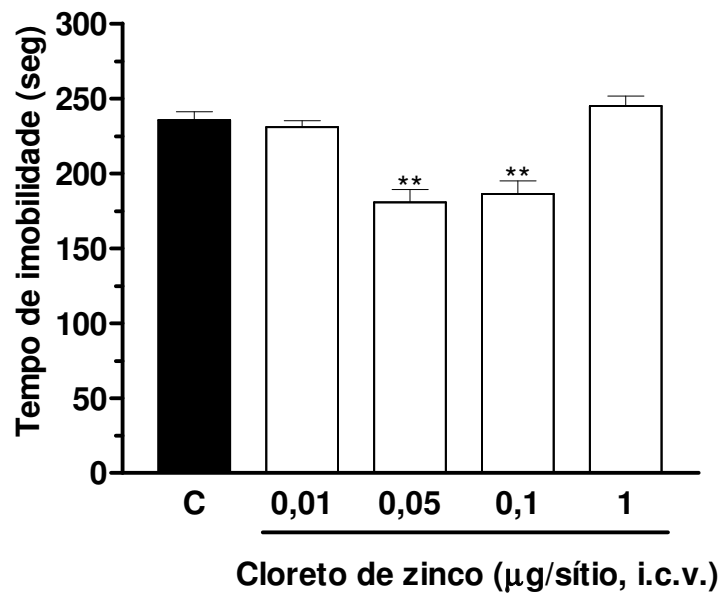
O tempo de imobilidade no TNF e TSC dos animais tratados com cloreto de zinco está mostrado nas Figuras 4A e 4B, respectivamente. A ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa para o efeito do cloreto de zinco no tempo de imobilidade tanto no TNF [ $F(3,26)=13,8$ ;  $P<0,01$ ] quanto no TSC [ $F(3,20)=30,5$ ;  $P<0,01$ ]. O teste de *post hoc* de Duncan mostrou que o cloreto de zinco na dose de 30 mg/kg, i.p., diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos animais quando foram testados no TNF e, nas doses de 10 e 30 mg/kg, i.p., reduziu a imobilidade dos animais no TSC, em comparação ao grupo controle.

A Figura 5 mostra o efeito da administração de cloreto de zinco por via intracerebroventricular no tempo de imobilidade no TNF. A ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa entre os grupos para o efeito do cloreto de zinco no tempo de imobilidade [ $F(4,38)=17,78$ ;  $P<0,01$ ]. O teste *post hoc* de Duncan indicou que o tratamento com cloreto de zinco causou uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais no TNF nas doses de 0,05 e 0,1  $\mu\text{g/sítio}$ .

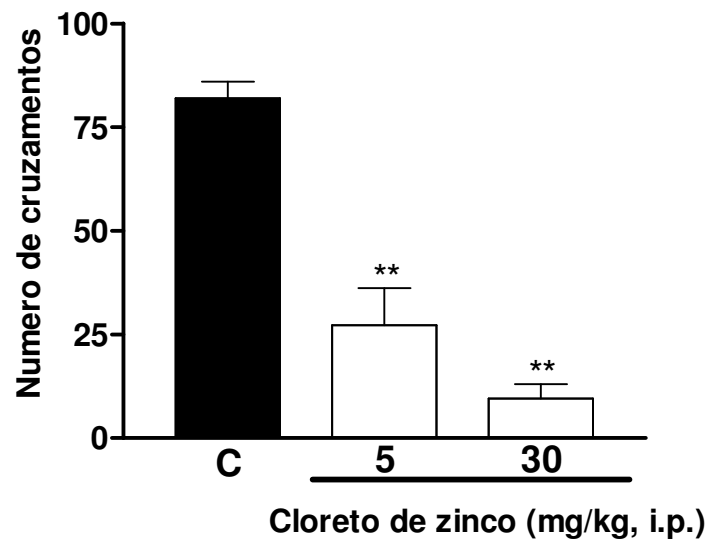
A ANOVA de uma via indicou uma diferença significativa entre os grupos tratados com cloreto de zinco no número de cruzamentos no teste do campo aberto (TCA) [ $F(2,21)=38,7$ ;  $P<0,01$ ]. O teste *post hoc* de Duncan indicou que houve uma redução da locomoção nos grupos tratados com cloreto de zinco nas doses de 5 e 30 mg/kg, i.p. (Figura 6).



**Figura 4.** Efeito da administração aguda de cloreto de zinco (5–30 mg/kg, i.p.) no TNF (A) e no TSC (B). O cloreto de zinco foi administrado 30 minutos antes dos testes. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-8$ ). \*\* $P<0,01$  quando comparado com o grupo controle (C) tratado com salina.



**Figura 5.** Efeito da administração aguda de cloreto de zinco (0,001–1 µg/sítio, i.c.v.) no TNF. O cloreto de zinco foi administrado 15 minutos antes do teste. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-8$ ). \*\* $P<0,01$  quando comparado com o grupo controle (C) tratado com salina.



**Figura 6.** Efeito do tratamento com cloreto de zinco no número de cruzamento no teste do campo aberto. Os animais foram tratados com cloreto de zinco ou salina (controle; C) 30 minutos antes do teste. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-8$ ).  $**P<0,01$  quando comparado com o grupo controle (C).

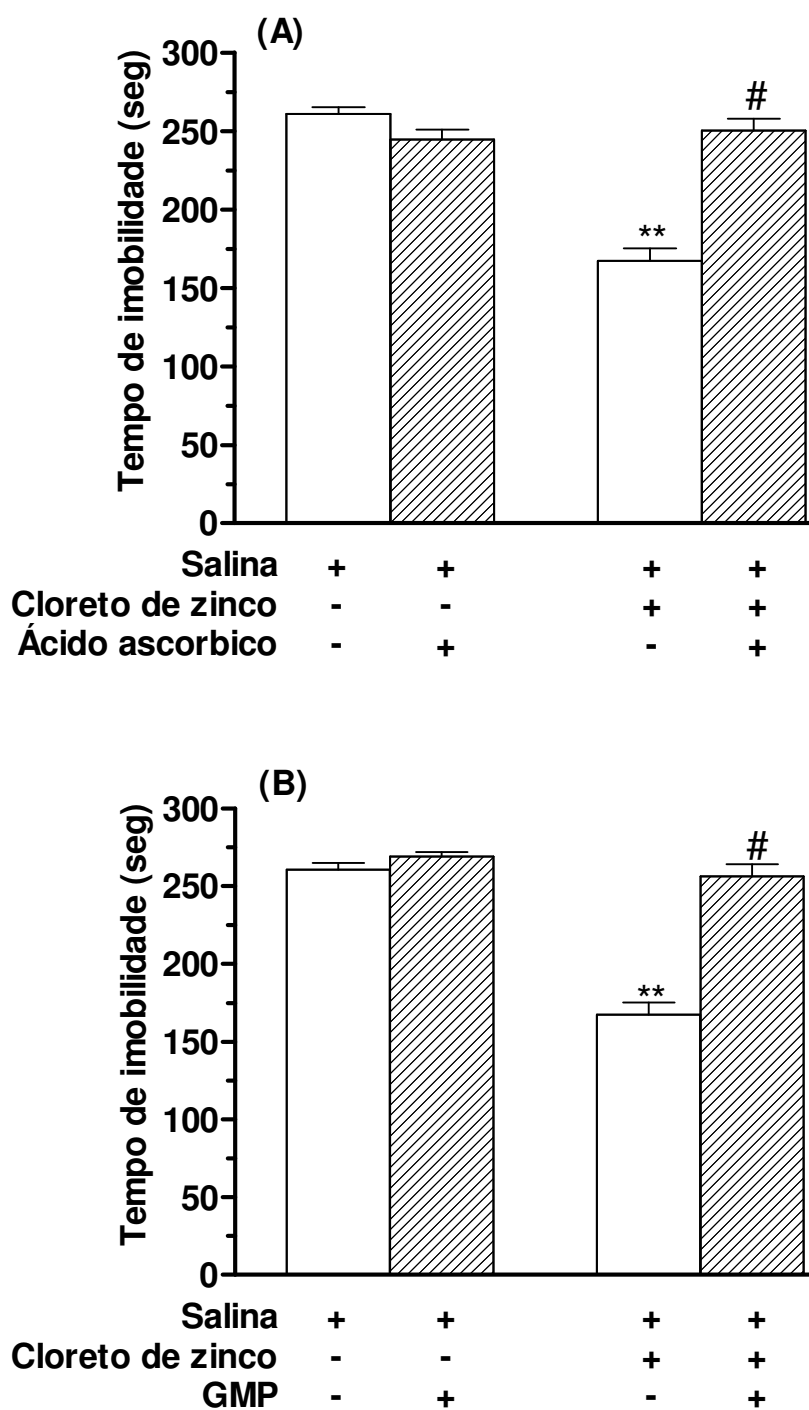
### *Sistema glutamatérgico*

A Figura 7A mostra o efeito do pré-tratamento com ácido ascórbico (100 mg/kg, i.p., um putativo neuromodulador que antagoniza os receptores NMDA) na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do pré-tratamento [ $F(1,37)=41,0$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(1,37)=23,9$ ;  $P<0,01$ ] e da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(1,37)=52,9$ ;  $P<0,01$ ].

Na Figura 7B pode-se observar os resultados do tratamento com GMP (100 mg/kg, i.p., nucleotídeo conhecido por bloquear algumas ações provocadas por NMDA) no efeito antidepressivo provocado por cloreto de zinco. O teste ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento [ $F(1,37)=67,1$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(1,37)=56,3$ ;  $P<0,01$ ] e da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(1,37)=38,5$ ;  $P<0,01$ ].

Uma análise *post hoc* indicou que o efeito antidepressivo do cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) foi completamente prevenido pelo tratamento dos animais com ácido ascórbico e com GMP.

A Tabela 2 apresenta o efeito do cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.), MK-801 (0,01 mg/kg, i.p., antagonista não competitivo de receptores NMDA) e imipramina (15 mg/kg, i.p., antidepressivo tricíclico) sozinhos ou em combinação no tempo de imobilidade no TNF. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento na imobilidade dos animais submetidos ao TNF [ $F(9,65)=14,7$ ;  $P<0,01$ ]. O tempo de imobilidade dos animais tratados com cloreto de zinco mais MK-801 não foi diferente do resultado obtido com o cloreto de zinco ou MK-801 sozinhos. Por outro lado, o tratamento com cloreto de zinco mais imipramina teve um efeito maior no TNF do que a administração das drogas isoladamente.



**Figura 7.** Efeito do pré-tratamento dos animais com ácido ascórbico (100 mg/kg, i.p., A), ou GMP (100 mg/kg, i.p., B), na redução do tempo de imobilidade provocada por cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-11$ ).  $**P<0,01$  quando comparado com o grupo tratado com salina.  $\#P<0,01$  quando comparado com o grupo tratado com cloreto de zinco e pré-tratado com salina.

**Tabela 2.** Efeito do tratamento com cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p), MK-801 (0,01 mg/kg) e imipramina (15 mg/kg, i.p.) sozinhos ou em combinação no TNF.

<b>Tratamento</b>	<b>Dose (mg/kg, i.p.)</b>	<b>Tempo de imobilidade (seg/6 min)</b>
Salina/salina	- / -	260,4 ± 8,6
Salina/MK-801	- / 0,01	149,3 ± 12,7**
Imipramina/salina	15 / -	164,7 ± 9,2**
Cloreto de zinco/salina	30 / -	180,7 ± 12,0**
Cloreto de zinco/MK-801	30 / 0,01	164,1 ± 16,8*** <sup>a</sup>
Cloreto de zinco/imipramina	30 / 15	114,3 ± 9,4*** <sup>b</sup>
Imipramina/MK-801	15 / 0,01	96,0 ± 16,4*** <sup>c</sup>

A solução salina, a imipramina e o cloreto de zinco foram administrados 30 minutos antes do teste. O MK-801 foi administrado 15 minutos antes do teste. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=7-8).

\*\*P<0,01 vs o controle tratado com salina

<sup>a</sup>P<0,01 vs imipramina/MK-801 e P<0,05 quando comparado com o grupo cloreto de zinco/imipramina.

<sup>b</sup>P<0,01 vs o grupo cloreto de zinco/salina e P<0,05 quando comparado com os grupos imipramina/salina e cloreto de zinco/MK-801.

<sup>c</sup>P<0,01 vs os grupos cloreto de zinco/MK-801, cloreto de zinco/salina, imipramina/salina e salina/MK-801.

### ***Via da L-arginina-óxido nítrico***

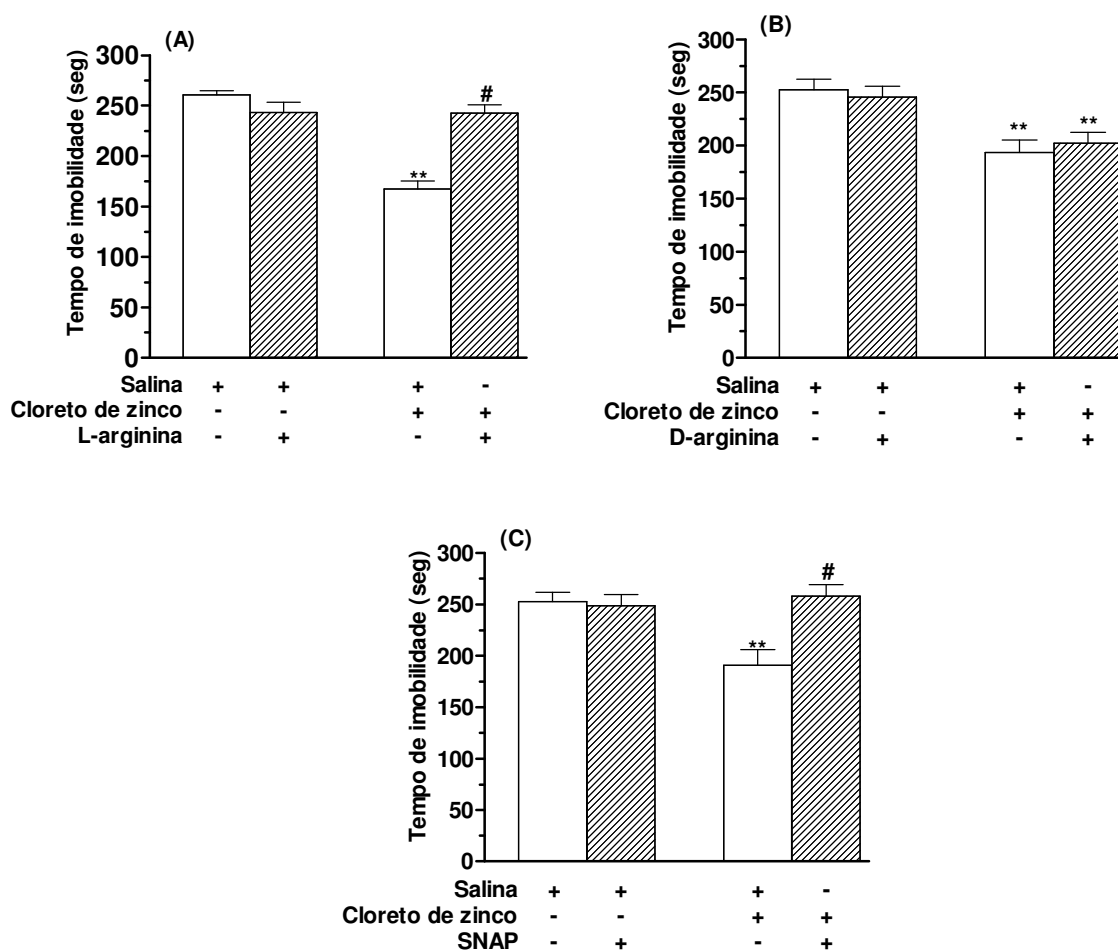
Na figura 8A é mostrada a influência do pré-tratamento com L-arginina (750 mg/kg, i.p., precursora do NO) no efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do pré-tratamento [ $F(1,37)=20,2$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(1,37)=53,4$ ;  $P<0,01$ ] e da interação entre pré-tratamento e tratamento [ $F(1,37)=52,2$ ;  $P<0,01$ ].



A Figura 8B mostra o efeito do pré-tratamento com D-arginina (750 mg/kg, um isômero inativo da L-arginina) no efeito do cloreto de zinco no TNF. A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do tratamento [ $F(1,20)=28,41$ ;  $P<0,01$ ], mas não do pré-tratamento [ $F(1,20)=0,00$ ;  $P=0,93$ ] e da interação entre pré-tratamento e tratamento [ $F(1,20)=0,66$ ;  $P=0,42$ ].

Pode-se observar na Figura 8C o resultado do tratamento dos camundongos com SNAP (25  $\mu\text{g/sitio}$ , i.c.v., doadora de NO) no efeito antidepressivos do cloreto de zinco no TNF. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento [ $F(1,20)=6,93$ ;  $P<0,05$ ], do tratamento [ $F(1,20)=4,79$ ;  $P<0,05$ ] e da interação entre pré-tratamento e tratamento [ $F(1,20)=8,80$ ;  $P<0,01$ ].

Uma análise *post hoc* indicou que o efeito antidepressivo do cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF foi completamente prevenido pelo pré-tratamento dos animais com L-arginina e com SNAP, mas não com D-arginina.

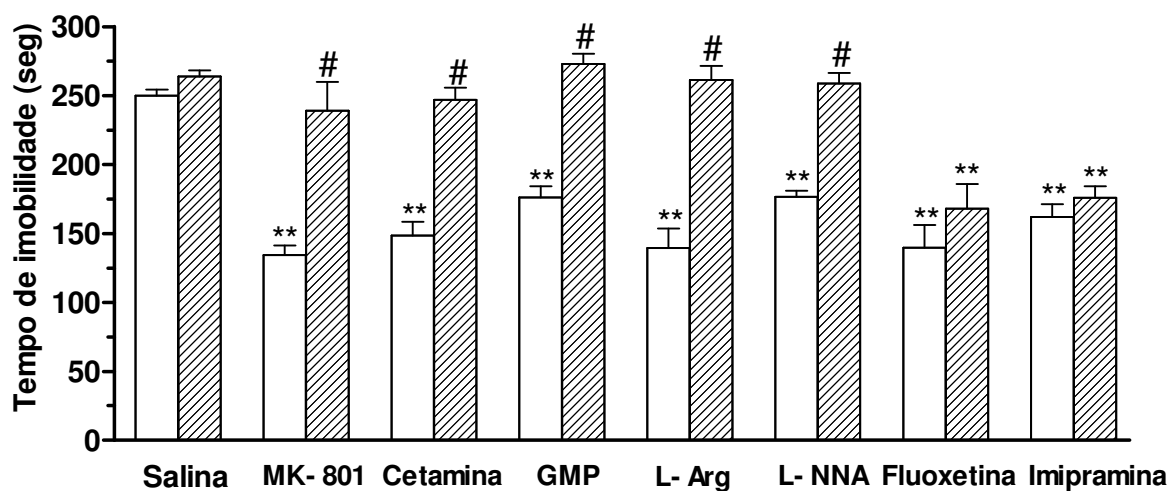


**Figura 8.** Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (750 mg/kg, i.p., A), D-arginina (750 mg/kg, i.p., B) ou SNAP (25 µg/sítio, i.c.v., C) na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-11$ ).  $**P<0,01$  quando comparado com o grupo tratado com salina.  $\#P<0,01$  quando comparado com o grupo tratado com cloreto de zinco e pré-tratado com salina.

### ***Modulação exercida pelo cloreto de zinco sobre a ação de antidepressivos no***

#### ***TNF***

Na figura 9 esta representado o efeito do pré-tratamento dos animais com uma dose sub-ativa de cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) no efeito antidepressivo do MK-801 (0,01 mg/kg, i.p), cetamina (5 mg/kg, i.p., antagonista não competitivo de receptores NMDA), GMP (50 mg/kg, i.p.), L-arginina (500 mg/kg, i.p.), L-NNA (3 mg/kg, i.p., inibidor da NO sintase), fluoxetina (32 mg/kg, i.p., inibidor seletivo da recaptação de serotonina) ou imipramina (15 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias mostrou que houve um efeito significativo do pré-tratamento [ $F(7,108)=19,9$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(7,108)=184,2$ ;  $P<0,01$ ] e da interação pré-tratamento  $\times$  tratamento [ $F(7,108)=9,7$ ;  $P<0,01$ ]. A análise *post hoc* indicou que o pré-tratamento com cloreto de zinco preveniu completamente o efeito antidepressivo do MK-801, da cetamina, do GMP, da L-arginina ou da L-NNA, mas não modificou o efeito antidepressivo da fluoxetina ou da imipramina.



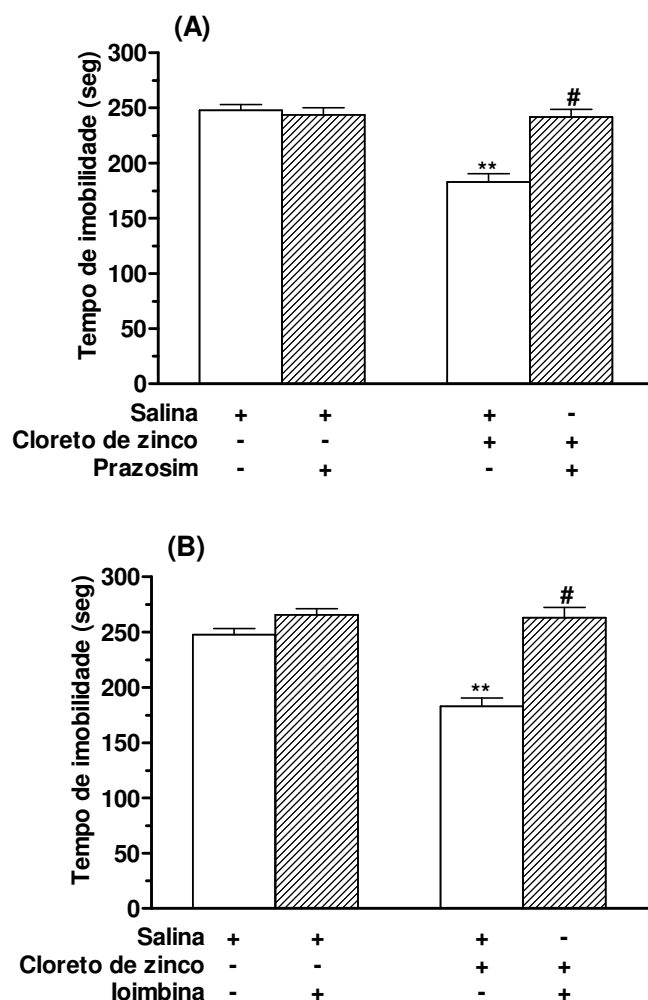
**Figura 9.** Efeito da administração de uma dose sub-ativa de cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) na redução do tempo de imobilidade provocada pelo MK-801 (0,01 mg/kg, i.p.), cetamina (5 mg/kg, i.p.), GMP (50 mg/kg, i.p.), L-arginina (500 mg/kg, i.p.), L-NNA (3 mg/kg, i.p.), fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) ou imipramina (15 mg/kg, i.p.) no TNF. As colunas brancas representam os animais pré-tratados com salina e as colunas listradas representam os animais pré-tratados com cloreto de zinco 30 minutos antes das drogas (MK-801, cetamina, GMP, L-arginina, L-NNA, fluoxetina e imipramina). Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=8-12$ ). \*\* $P<0,01$  quando comparado com o grupo tratado com salina. # $P<0,01$  quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina.

### ***Sistema adrenérgico***

Na Figura 10A verifica-se o efeito do pré-tratamento com prazosim (62,5 µg/kg, i.p., antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos) na redução da imobilidade provocada pelo cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou um efeito do pré-tratamento [ $F(1,26)=13,1$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(1,26)=27,9$ ;  $P<0,01$ ] e da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(1,26)=17,8$ ;  $P<0,01$ ].

A Figura 10B mostra os resultados do pré-tratamento com ioimbina (1mg/kg, i.p., antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos) no efeito antidepressivo provocado por cloreto de zinco no TNF. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento [ $F(1,26)=43,2$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(1,26)=29,9$ ;  $P<0,01$ ] e da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(1,26)=15,8$ ;  $P<0,01$ ].

Uma análise *post hoc* indicou que o efeito antidepressivo do cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) foi completamente prevenido pelo pré-tratamento dos animais com prazosim ou ioimbina.



**Figura 10.** Efeito do pré-tratamento dos animais com prazosim (62,5 µg/kg, i.p., A), ou ioimbina (1 mg/kg, i.p., B), na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-11$ ). \*\* $P<0,01$  quando comparado com o grupo tratado com salina. # $P<0,01$  quando comparado com o grupo tratado com cloreto de zinco e pré-tratado com salina.

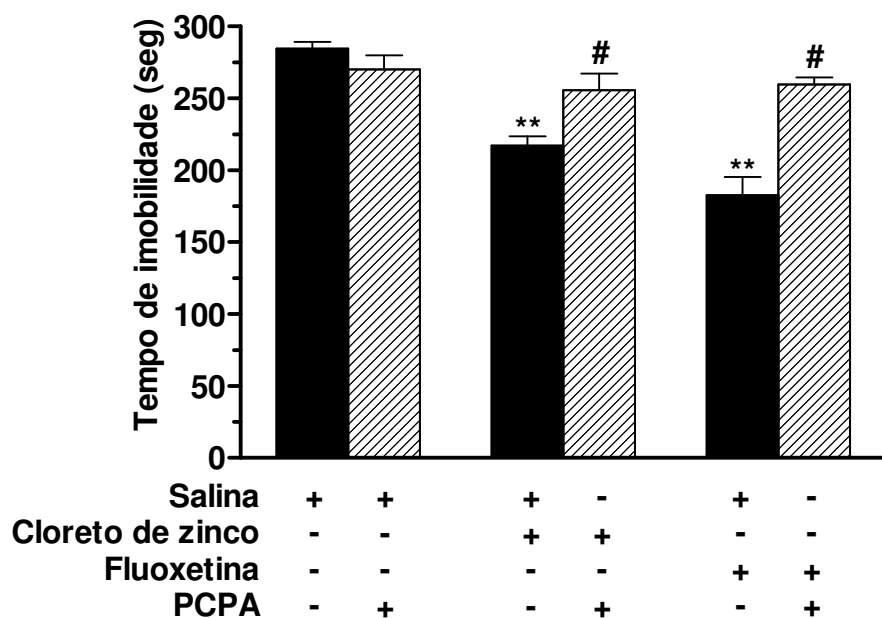
### *Sistema serotoninérgico*

Na Figura 11 é mostrado o efeito do pré-tratamento com o inibidor da síntese de serotonina PCPA (100 mg/kg, i.p., 4 dias consecutivos, uma vez ao dia) ou com salina sobre o tempo de imobilidade dos animais tratados com cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) ou com fluoxetina (32 mg/kg, i.p.). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do pré-

tratamento [ $F(1,32)=18,9$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(2,32)=18,0$ ;  $P<0,01$ ] e da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(2,32)=11,2$ ;  $P<0,01$ ]. O teste *post hoc* indicou que os efeitos antidepressivos do cloreto de zinco e da fluoxetina no TNF foram revertidos completamente pelo pré-tratamento com PCPA.

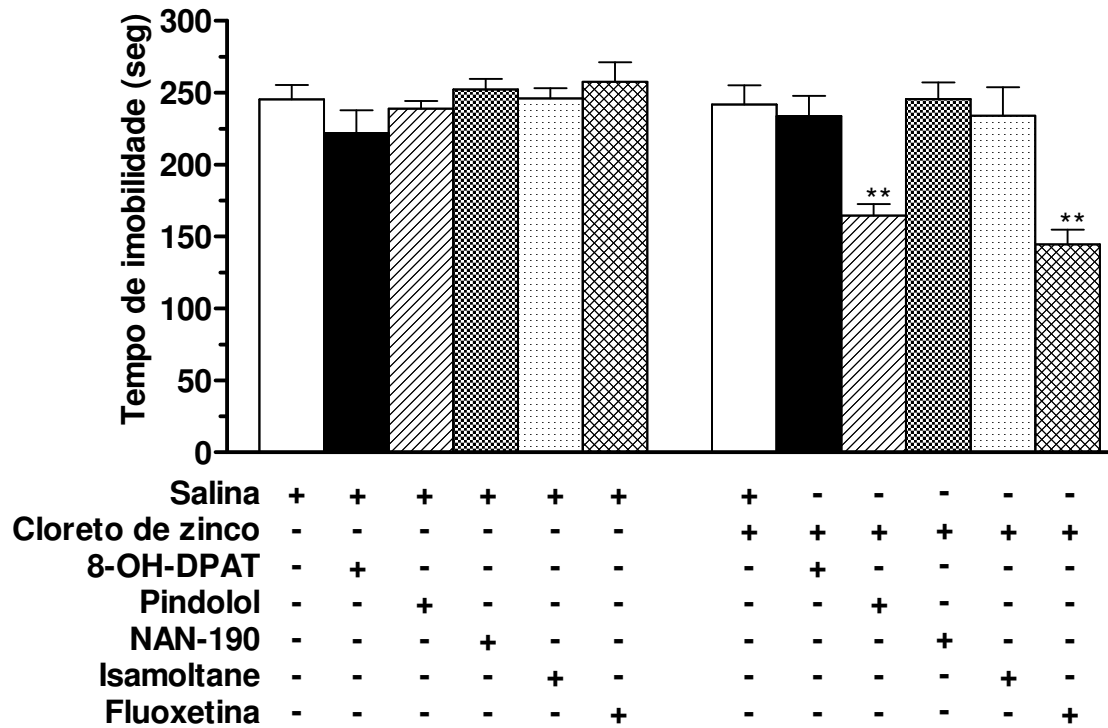
Na Figura 12 está mostrado o efeito do pré-tratamento com cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p., dose sub-ativa no TNF) na redução do tempo de imobilidade causada pela administração de doses sub-ativas de 8-OH-DPAT (1 mg/kg, i.p., agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>), pindolol (32 mg/kg i.p., bloqueador  $\beta$ -adrenérgico com atividade antagonista 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>1B</sub>), NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., antagonista 5-HT<sub>1A</sub>), isamoltane (0,1 mg/kg, i.p., antagonista 5-HT<sub>1B</sub>) ou fluoxetina (10 mg/kg, i.p., inibidor seletivo da recaptação de serotonina) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do pré-tratamento [ $F(1,76)=19,9$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(5,76)=5,2$ ;  $P<0,01$ ] e da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(5,76)=7,1$ ;  $P<0,01$ ]. O teste *post hoc* indicou que o pré-tratamento com cloreto de zinco causou efeito antidepressivo sinérgico com pindolol e com fluoxetina no TNF.

Na Figura 13 observa-se o efeito do pré-tratamento com cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p., uma dose sub-ativa no TNF) na redução do tempo de imobilidade de doses sub-ativas de cetanserina (5 mg/kg, i.p, antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>), ritanserina (4 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>) ou DOI (1 mg/kg, i.p., agonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do pré-tratamento [ $F(1,46)=9,6$ ;  $P<0,01$ ], do tratamento [ $F(3,46)=7,6$ ;  $P<0,01$ ] e da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(3,46)=4,6$ ;  $P<0,01$ ]. O teste *post hoc* indicou que o pré-tratamento com cloreto de zinco somente foi capaz de aumentar o efeito antidepressivo do DOI no TNF.

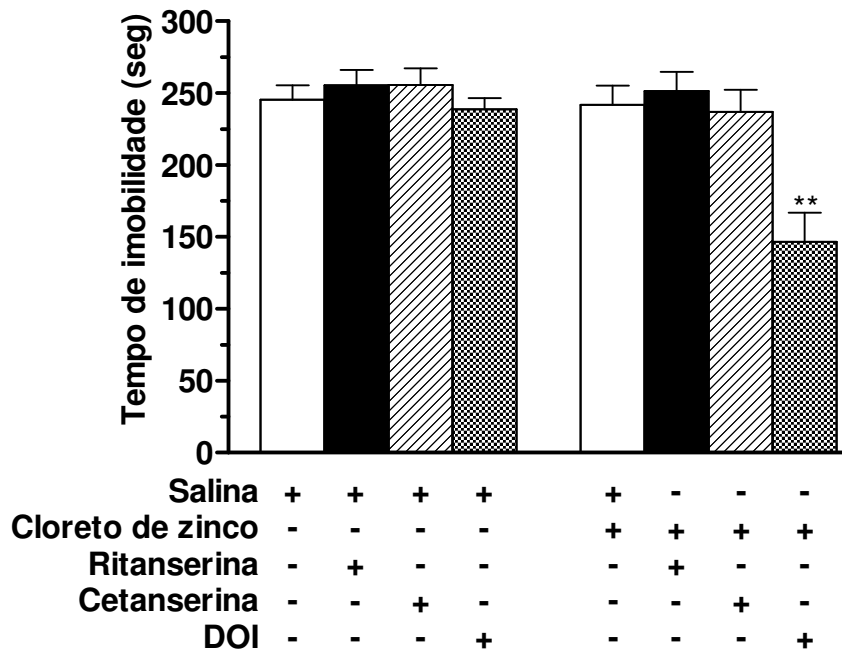


**Figura 11.** Efeito do pré-tratamento dos animais por 4 dias consecutivos com PCPA (100 mg/kg, i.p.), na redução do tempo de imobilidade provocada por cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no TNF. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-11$ ).  $**P<0,01$  quando comparado com o grupo tratado com salina.  $\#P<0,01$  quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com salina.





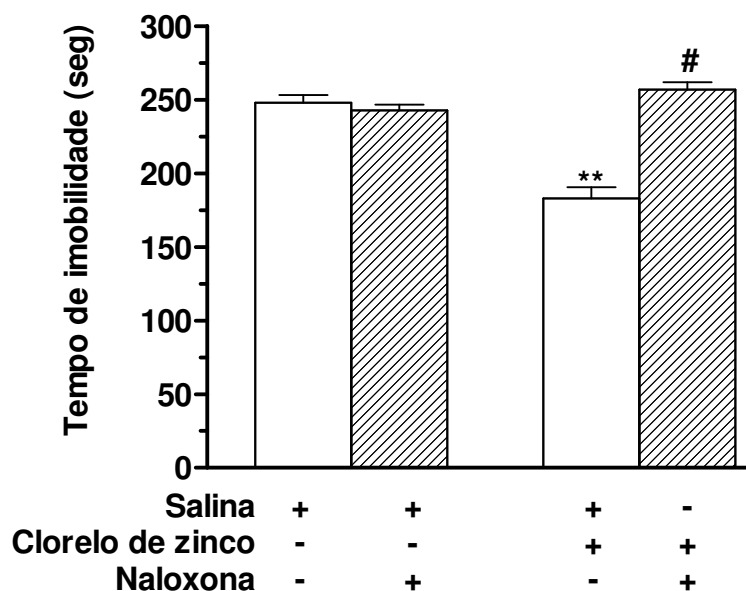
**Figura 12.** Efeito antidepressivo sinérgico do cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) com 8-OH-DPAT (1 mg/kg, i.p.), pindolol (32 mg/kg i.p.), NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.), isamoltane (0,1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, i.p) no TNF. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-11$ ).  $**P<0,01$  quando comparado com o grupo com salina/salina, cloreto de zinco/salina ou com o mesmo grupo pré-tratado com salina.



**Figura 13.** Efeito antidepressivo sinérgico do cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) com ritanserina (4 mg/kg, i.p.), cetanserina (5 mg/kg, i.p.) ou DOI (1 mg/kg, i.p.) no TNF. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=6-11$ ).  $**P<0,01$  quando comparado com o grupo com salina/salina, cloreto de zinco/salina ou com o mesmo grupo pré-tratado com salina.

## Sistema opióide

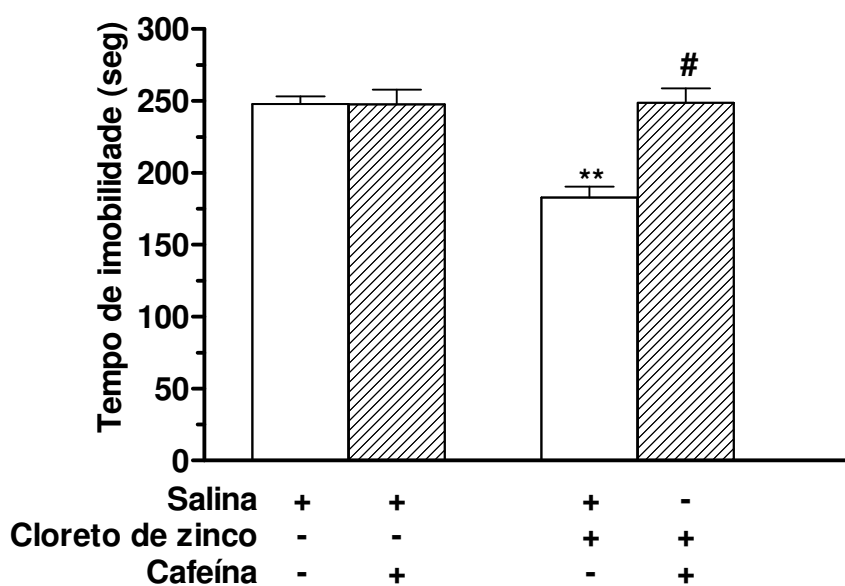
Na Figura 14 verifica-se o efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo dos receptores opióides) na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou um efeito do pré-tratamento [ $F(1,26) = 32,9; P < 0,01$ ], do tratamento [ $F(1,26) = 17,8; P < 0,01$ ] bem como da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(1,26) = 43,4; P < 0,01$ ]. O teste *post hoc* indicou que a naloxona foi capaz de reverter totalmente o efeito antidepressivo do cloreto de zinco.



**Figura 14.** Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.) na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n=8$ ). \*\* $P < 0,01$  quando comparado com o grupo tratado com salina. # $P < 0,01$  quando comparado com o grupo tratado com cloreto de zinco e pré-tratado com salina.

### *Sistema adenosinérgico*

Na Figura 15 verifica-se o efeito do pré-tratamento com cafeína (3 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo dos receptores de adenosina) na redução do tempo de imobilidade provocada pelo cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou um efeito do pré-tratamento [ $F(1,26) = 6,5; P < 0,05$ ], do tratamento [ $F(1,26) = 17,4; P < 0,01$ ] e da interação entre o pré-tratamento e o tratamento [ $F(1,26) = 6,7; P < 0,05$ ]. O teste *post hoc* indicou que a cafeína foi capaz de reverter totalmente o efeito antidepressivo do cloreto de zinco.



**Figura 15.** Efeito do pré-tratamento dos animais com cafeína (3 mg/kg, i.p.), na redução do tempo de imobilidade provocada por cloreto de zinco (30 mg/kg, i.p.) no TNF. Os valores estão expressos como média + e.p.m. ( $n = 6-11$ ). \*\* $P < 0,01$  quando comparado com o grupo tratado com salina. # $P < 0,01$  quando comparado com o grupo tratado com cloreto de zinco e pré-tratado com salina.

## 6. Discussão

No presente estudo, o efeito antidepressivo do cloreto de zinco está de acordo com estudos prévios realizados em camundongos e em ratos que mostraram que o tratamento com sulfato de zinco ou hidroaspartato de zinco produz um efeito antidepressivo no TNF (Krocza et al., 2000, 2001; Nowak et al., 2003b).

O efeito antidepressivo do cloreto de zinco também foi verificado no TSC, um derivado do TNF. Ambos os testes, o TNF e o TSC são modelos amplamente aceitos para testar novas drogas antidepressivas, porque são sensíveis a todas as principais classes de drogas antidepressivas, incluindo os tricíclicos, ISRS, inibidores da MAO e atípicos (Porsolt et al., 1977). Além disso, estes testes apresentam grande reprodutibilidade e são de fácil execução (Cryan et al., 2002).

O TSC, assim como o TNF, induz um estado de imobilidade nos animais após um período de agitação e tentativa de fuga, o qual se acredita que reproduza uma condição próxima à depressão humana (Willner, 1984; Steru et al., 1985). Tem sido descrito que as drogas antidepressivas reduzem o tempo de imobilidade de camundongos e ratos em ambos os testes (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985) e vários estudos mostraram que sua efetividade se correlaciona significativamente com o potencial clínico destas drogas (Willner, 1984).

O cloreto de zinco teve um efeito antidepressivo no TSC em uma dose menor que no TNF, o que pode ter acontecido devido a uma maior sensibilidade farmacológica no TSC ao zinco sob as condições experimentais usadas (Thierry et al., 1986). De fato, diferenças no desempenho intra e interlinhagens no TNF e no TSC têm sido demonstradas e podem indicar que a circuitaria nervosa que medeia o comportamento neste testes não é idêntica (Bai et al.,

2001). A ação antidepressiva do cloreto de zinco nestes dois modelos reforça a hipótese do envolvimento do zinco na modulação da depressão.

O TNF e o TSC, em alguns casos, podem levar à obtenção de um resultado falso positivo ou negativo (Borsini e Meli, 1988). As drogas que aumentam a atividade locomotora podem produzir resultados falso positivos e antidepressivos como a bupropiona, nomifensina e amineptina seriam rejeitados, uma vez que eles aumentam a atividade locomotora dos animais (Borsini e Meli, 1988).

Deve ser notado que a diminuição no tempo de imobilidade no TNF e TSC induzida pelo cloreto de zinco não pode ser atribuída a uma ação psicoestimulante do zinco. Ao contrário, neste estudo, o cloreto de zinco causou uma redução na atividade locomotora no campo aberto, confirmando dados de estudos prévios (Krocza et al., 2000, 2001).

O efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF não pode ser atribuído a uma ação periférica indireta do metal, uma vez que o tratamento com cloreto de zinco pela via i.c.v., nas doses de 0,05 e 0,1 µg/sítio diminuiu o tempo de imobilidade dos camundongos no TNF. A farmacocinética do zinco no encéfalo está intimamente relacionada a sua ligação a compostos no soro que estão divididos entre proteínas (98%) e ligantes com baixo peso molecular (1-2%), embora uma pequena parte do zinco ( $10^{-10}$  a  $10^{-9}$  M) esteja livre no soro. O transporte deste metal para o encéfalo parece envolver a barreira sangue-fluido cérebro espinhal, além do seu transporte através da barreira hemato-encefálica. A concentração de zinco extracelular no encéfalo é de aproximadamente 0,15 µM, enquanto que a concentração intracelular é de aproximadamente 150 µM, o que indica a presença de um mecanismo dependente de energia para o transporte de zinco para o meio intracelular de neurônios e astrócitos. De fato, quatro transportadores de zinco, nomeados de ZnT1 a ZnT4 foram identificados em mamíferos e estão associados ao influxo de zinco, entretanto nenhum transportador relacionado com a captação do zinco para células nervosas foi clonado. Um

transportador chamado DMT1 foi proposto como o responsável pela alta captação de zinco existente nas células piramidais e granulares do hipocampo por estar altamente presente nesta região (Takeda, 2000).

O efeito antidepressivo do cloreto de zinco em modelos animais de depressão pode ter uma relevância fisiológica, uma vez que a hipozincemia tem sido relatada na literatura (Maes et al., 1994, 1997, 1999). Os tratamentos crônicos com imipramina, citalopram ou choque eletro-convulsivo induzem uma elevação na concentração de zinco hipocampal, indicando um papel significativo para o zinco no mecanismo de ação das terapias antidepressivas (Nowak e Schlegel-Zawadzka, 1999). Apesar do fato de que o SNC contém altas concentrações de zinco, o qual é liberado mediante despolarização dos terminais nervosos centrais durante a atividade sináptica, o papel do zinco neuronal liberado sobre a função normal no encéfalo não é bem compreendido (Choi e Koh, 1998).

O zinco é um inibidor endógeno dos receptores NMDA e também inibe a óxido nítrico sintase, entre outros efeitos no SNC (Choi e Koh, 1998; Mittal et al., 1995). Existem numerosas evidências apontando um envolvimento dos receptores NMDA na modulação da depressão. De fato, há uma diminuição na capacidade do zinco em inibir o “*binding*” do [<sup>3</sup>H]MK-801 no córtex e hipocampo de vítimas de suicídio (Nowak et al., 2003a), o que significa uma alteração na função dos receptores NMDA nestas regiões cerebrais. Tanto estudos pré-clínicos como clínicos indicam que compostos que reduzem a transmissão nos receptores NMDA exercem um efeito antidepressivo (Skolnick et al., 1999). Somando-se a isto, alguns estudos demonstraram que, ao menos sob algumas condições experimentais, a administração de inibidores da NOS produz um efeito antidepressivo no TNF e no TSC (Harkin et al., 1999, 2003; Da Silva et al., 2000; Yildiz et al., 2000; Volke et al., 2003). Então, no presente estudo foi testada a hipótese de o zinco exercer um efeito antidepressivo, inibindo os receptores NMDA e a síntese de NO.

O envolvimento dos receptores NMDA no efeito antidepressivo do cloreto de zinco pode ser inferido pela demonstração de que o pré-tratamento dos camundongos com GMP ou com ácido ascórbico, em doses que não produzem efeito *per se* no TNF (Eckeli et al., 2000), bloqueou completamente o efeito antidepressivo do cloreto de zinco neste mesmo teste. O GMP é um nucleotídeo endógeno que está presente em altas concentrações no SNC. Tem se postulado que ele antagoniza algumas ações do glutamato e seus agonistas (Malcon et al., 1997; Regner et al., 1998; Schmidt et al., 2000). Eckeli et al. (2000) demonstraram que tratamentos agudos com GMP produzem um efeito antidepressivo, dependendo da dose, tanto no TNF quanto no TSC, provavelmente através de uma inibição dos receptores NMDA. Além disso, foi recentemente demonstrado que o GMP pode reverter o efeito antidepressivo da agmatina no TNF, provavelmente prevenindo o bloqueio do receptor NMDA por esta amina (Zomkowski et al., 2002). Além disto, tanto o pré-tratamento com GMP como com o ácido ascórbico preveniram a ação antidepressiva da melatonina no TSC (Mantovani et al., 2003).

Acredita-se que o ácido ascórbico tenha uma ação como um neuromodulador no SNC além da sua ação como antioxidante. Tem sido demonstrado que o ácido ascórbico modula tanto a neurotransmissão mediada por dopamina quanto por glutamato (Majewska et al., 1990b; Rice 2000), inibindo a função do receptor NMDA por um fenômeno redox (Majewska et al., 1990a, 1990b; Gozlan e Ben-Ari, 1995; Rice, 2000). Entretanto, a ação antidopaminérgica do ácido ascórbico requer doses sistêmicas relativamente altas (1000 mg/kg, i.p.) em ratos (Gulley e Rebec, 1999). O conjunto destes dados sugere que o pré-tratamento com o ácido ascórbico preveniu o efeito antidepressivo do cloreto de zinco possivelmente por alterar o estado redox do receptor NMDA, modulando, então, a função destes receptores (Majewska et al., 1990 a; 1990b; Gozlan e Ben-Ari, 1995; Rice, 2000). Este resultado estaria de acordo com a observação de que existe uma menor inibição das correntes



iônicas mediadas pela ativação dos receptores NMDA pelo zinco sob condições redutoras (Choi et al., 2001).

O envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF foi evidenciado pela reversão do seu efeito antidepressivo pelo pré-tratamento dos camundongos com o substrato da NOS, L-arginina, mas não com o isômero inativo D-arginina, em doses que *per se* não produziram efeito no TNF (Da Silva et al., 2000). Este resultado pode indicar que, ao menos em parte, o efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF pode ser devido a uma inibição da NOS. Existe um consenso geral de que há uma ativação da NOS neuronal em consequência do influxo de cálcio que ocorre devido à ativação dos receptores NMDA (Contestabile, 2000). Outra importante evidência suportando a hipótese de que o cloreto de zinco exerce seu efeito antidepressivo por meio de uma inibição da síntese de NO vem do fato de que o seu efeito no TNF foi revertido pelo pré-tratamento com SNAP, um doador de NO.

O efeito antidepressivo da administração do antagonista não competitivo do receptor NMDA, MK-801, ou da imipramina no TNF observado neste estudo está de acordo com resultados prévios (Eckeli et al., 2000; Zomkowski et al., 2002) e ocorre em doses que não alteram a atividade locomotora (Eckeli et al., 2000). Os dados demonstrando a ausência de efeito sinérgico ou aditivo na imobilidade de camundongos tratados com MK-801 após administração prévia de cloreto de zinco reforçam a hipótese de que o zinco exerce um efeito antidepressivo no TNF por bloquear a ativação do receptor NMDA, desta forma, prevenindo a ligação do MK-801 ao receptor NMDA. Está bem estabelecido que o MK-801 se liga preferencialmente ao receptor NMDA ativado (Javitt e Zukin, 1989), interagindo com um sítio localizado dentro do poro do canal.

Os resultados deste trabalho também mostram um efeito somatório do cloreto de zinco (ou MK-801) mais imipramina na redução do tempo de imobilidade no TNF, com resultados

similares a dados da literatura que também mostram o mesmo efeito com GMP (ou MK-801) mais imipramina, bem como com agmatina (uma amina formada pela descarboxilação da L-arginina que produz um efeito antidepressivo no TNF através de um mecanismo dependente do bloqueio dos receptores NMDA e da inibição da NOS) mais imipramina (Eckeli et al., 2000; Zomkowski et al., 2002). O efeito somatório do tratamento com doses sub-ativas de cloreto de zinco mais imipramina no TNF havia sido demonstrado previamente em camundongos e ratos (Krocicka et al., 2001). Foi demonstrado recentemente também que o tratamento crônico com a imipramina produz um aumento significativo na potência do zinco em inibir o “*binding*” de [<sup>3</sup>H]MK-801 em córtex cerebral de camundongos, indicando um aumento na afinidade do zinco ao receptor NMDA (Szewczyk et al., 2001).

O efeito antidepressivo do MK-801, cetamina, imipramina, fluoxetina e L-NNA demonstrado neste estudo também está descrito na literatura em estudos pré-clínicos e clínicos (Skolnick, 1999; Eckeli et al., 2000; Da Silva et al., 2000, Berman et al., 2000; Kudoh et al., 2002; Harkin et al., 2003). No entanto, os efeitos antidepressivos do GMP e da L-arginina foram demonstrados somente em testes pré-clínicos (Da Silva et al., 2000; Eckeli et al., 2000). Tanto a L-arginina quanto o L-NNA produzem efeitos antidepressivos no TNF, sugerindo um papel dual para o NO na modulação da depressão (Da Silva et al., 2000). Este efeito dual do NO na depressão também é sugerido por trabalhos que apresentam resultados divergentes. Neste sentido é importante mencionar que foram encontrados níveis aumentados de nitrato no sangue (Suzuki et al., 2001) de indivíduos deprimidos, o que pode representar níveis aumentados de NO na depressão, como também foi relatado um aumento da atividade da enzima arginase, envolvida na hidrólise da L-arginina, o que poderia significar que o NO desempenha um papel antidepressivo (Elgün e Kumbasar, 2000).

A reversão do efeito antidepressivo do MK-801, da cetamina, do GMP, da L-arginina e do L-NNA, mas não da imipramina e da fluoxetina pelo pré-tratamento com uma dose sub-

ativa de cloreto de zinco reforça a hipótese de que o efeito primário deste metal na modulação da depressão pode ser devido a sua ação nos receptores NMDA. Estes resultados são similares àqueles obtidos por Mantovani et al. (2003) que obtiveram esta mesma modulação do efeito do MK-801, cetamina, GMP, L-arginina e L-NNA, mas não dos efeitos da imipramina ou fluoxetina pelo pré-tratamento dos camundongos com uma dose sub-ativa de melatonina. Este neurohormônio, assim como o zinco, possui efeito antidepressivo, pelo menos em parte, por modular os receptores NMDA. Os resultados estão também de acordo com o fato do zinco modular tanto o “*binding*” de agonistas como de antagonistas de receptores NMDA (Terse e Komysek, 1997). Uma possibilidade é a de que o zinco, em baixas doses, possa interagir com o receptor NMDA se ligando em um sítio de alta afinidade. Desta maneira, o zinco poderia modular a ativação do receptor e, conseqüentemente, o efeito dos compostos que reduzem o tempo de imobilidade no TNF por reduzir a ativação do receptor NMDA, ou por afetar a via L-arginina-óxido nítrico, que está diretamente relacionada com a ativação dos receptores NMDA. Entretanto, a ausência de efeito do cloreto de zinco *per se* em uma dose baixa no TNF (5 mg/kg, i.p.) requer mais estudos para melhor caracterizar essa interação do metal com o receptor. Uma possibilidade é que nesta dose uma redução da atividade locomotora poderia ocultar um eventual efeito antidepressivo, uma vez que este é evidenciado pela redução do tempo de imobilidade do animal no TNF.

Os resultados deste estudo também mostram que o PCPA, inibidor da enzima triptofano hidroxilase, foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF, o que sugere a participação do sistema serotoninérgico no efeito do cloreto de zinco neste teste. Este resultado está de acordo com o fato de que os efeitos antidepressivos do GMP e do MK-801 no TNF, mediados pela inibição dos receptores NMDA, também foram revertidos pela administração prévia de PCPA (Eckeli et al., 2000). O pré-tratamento com PCPA também foi capaz de reverter o efeito antidepressivo da fluoxetina (ISRS) no TNF, um

resultado similar ao descrito na literatura (Page et al., 1999; Eckeli et al., 2000), o que sugere que o pré-tratamento dos animais com PCPA foi eficaz em depletar a serotonina endógena. O sistema serotoninérgico está envolvido no mecanismo de ação da maioria dos antidepressivos, incluindo os antidepressivos tricíclicos, inibidores da MAO e ISRS (Nemeroff e Owens, 2002). Além disso, existem alguns estudos demonstrando que antagonistas de receptores NMDA e inibidores da NOS podem modular a neurotransmissão serotoninérgica uma vez que as duas classes de drogas podem aumentar a liberação de serotonina em algumas regiões cerebrais (Wegener et al., 2000; Callado et al., 2000; Smith e Whitton, 2000) e que o tratamento com antidepressivos como citalopram, paroxetina e imipramina diminuem a atividade da NOS hipocampal em estudos *in vitro* (Wegener et al., 2003). Desta maneira, embora fique evidente a participação do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF, resta saber se este efeito sobre o sistema serotoninérgico é um efeito direto ou um efeito indireto da ação do zinco sobre o sistema glutamatérgico, sugerida anteriormente neste estudo.

Os resultados deste estudo indicam que o efeito do cloreto de zinco no TNF parece ser mediado também por um antagonismo sobre os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, mas não sobre os receptores 5-HT<sub>1B</sub>. Esta conclusão é baseada no fato de o tratamento com cloreto de zinco mais pindolol (antagonista de receptores 5-HT<sub>1A/1B</sub>), mas não cloreto de zinco mais isamoltane (um antagonista de receptores 5-HT<sub>1B</sub>) ter produzido um efeito antidepressivo sinérgico no TNF. O envolvimento de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos na ação antidepressiva do cloreto de zinco no TNF está de acordo com o resultado de reversão da sua ação antidepressiva pelo pré-tratamento com PCPA. Esta conclusão está baseada no fato do pindolol agir como um antagonista de auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub>, aumentando a liberação de serotonina e o PCPA inibir a ação de drogas que agem pré-sinápticamente (Luscombe et al., 1993). Nossos resultados foram similares aos encontrados

na literatura, que mostram que o pindolol potencializa o efeito antidepressivo da clonidina no TNF (Redrobe and Bourin, 1998). De fato o pindolol tem sido usado na clínica para aumentar ou acelerar o efeito de antidepressivos (Artigas et al., 2001). O mecanismo pelo qual o pindolol age aumentando a ação de antidepressivos não é completamente compreendida. Uma possibilidade discutida na literatura é a de que a ação do pindolol resulta de um antagonismo nos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos nos núcleos da rafe, os quais mediante ativação levam a uma hiperpolarização e redução da frequência de disparo destes neurônios. Os ISRS aumentam a concentração de serotonina na fenda sináptica prevenindo a sua recaptação, o que leva à ativação dos auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub>. O pindolol pode agir prevenindo a ativação destes auto-receptores causada pelos ISRS e outras substâncias que agem através da serotonina, reduzindo então o “feedback” negativo normalmente exercida pela serotonina nos auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Isto leva a um aumento no disparo dos neurônios serotoninérgicos e conseqüentemente, eleva a quantidade de serotonina hipocampal e cortical (Artigas et al., 2001; Blier e de Montigny, 1994). Então é possível tanto que o cloreto de zinco potencialize o efeito do pindolol por inibir a recaptação de serotonina ou por agir diretamente sobre os auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

O efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF não foi potencializado pelo antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, NAN-190, ao contrário do observado com pindolol. Um estudo realizado por Redobre et al. (1998) mostrou que o NAN-190 e o pindolol potencializaram o efeito antidepressivo da clonidina. Entretanto, tem sido descrito na literatura que o NAN-190 exerce um antagonismo sobre os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, além de seu efeito sobre os receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Claustre et al., 1991; Yoshio et al., 2001). O efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF foi prevenido pela administração prévia de prazosim, um antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, sugerindo que a ativação destes receptores poderia ter importância para o efeito antidepressivo do cloreto de zinco. Este pode ser um dos

motivos pelo qual o efeito do NAN-190 não foi potencializado pela administração de uma dose sub-ativa de cloreto de zinco. Também é importante considerar que o NAN-190 parece ter uma ação preferencial em receptores pós-sinápticos do tipo 5-HT<sub>1A</sub> (Hjorth e Sharp, 1990). É possível, então, que a ausência de resultado antidepressivo sinérgico entre o NAN-190 e o cloreto de zinco seja resultado tanto da ação do NAN-190 sobre os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos como da sua ação preferencial em receptores 5-HT<sub>1A</sub> pós-sinápticos, ao contrário da ação do cloreto de zinco, que parece ser em receptores pré-sinápticos.

Neste estudo o tratamento com cloreto de zinco mais 8-OH-DPAT (um agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub>) não produziu um efeito antidepressivo sinérgico no TNF. Foi demonstrado que o 8-OH-DPAT *per se* produz um efeito antidepressivo no TNF (Kitamura e Nagatani, 1996; O'Neill e Conway, 2001). No entanto, foi proposto que o seu mecanismo de ação envolva um sítio pós sináptico, uma vez que o PCPA não foi capaz de reverter seu efeito (Wieland e Lucki, 1990; Kitamura e Nagatani, 1996). Desta forma, o fato de o efeito antidepressivo do cloreto de zinco ter sido prevenido por PCPA, e de seu efeito ser mediado, pelo menos em parte, pelo antagonismo nos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, (a administração de cloreto de zinco mais pindolol produziu um efeito sinérgico no TNF), poderia explicar a ausência de efeito sinérgico do cloreto de zinco com o 8-OH-DPAT.

O envolvimento dos receptores 5-HT<sub>2</sub> na fisiopatologia da depressão tem sido demonstrado (Middlemiss et al., 2002). Existem dados demonstrando que o antagonismo de receptores 5-HT<sub>2A</sub> é importante para o efeito de antidepressivos convencionais no TNF (Redrobe e Bourin, 1997; Van Oekelen et al., 2003). O agonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub> DOI, assim como diferentes classes de antidepressivos, causam a dessensibilização destes receptores (Van Oekelen et al., 2003). Além disto, a inibição por oligonucleotídeo antisense dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> induz um efeito antidepressivo no TNF (Sibille et al., 1997). Foi demonstrado em um estudo recente que um polimorfismo no gene dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> está

primariamente associado com pensamentos suicidas em pacientes com depressão, reforçando a importância dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> na modulação da depressão (Du et al., 2000). Por outro lado, o tratamento dos animais com cloreto de zinco com DOI produziu um efeito antidepressivo sinérgico, mas não com os antagonistas dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> cetanserina e ritanserina, indicando que o efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF pode ser mediado por um efeito como agonista nestes subtipos de receptores serotoninérgicos. De fato, em um estudo recente o tratamento com DOI potencializou o efeito antidepressivo do neuroesteróide 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (alopregnanolona) no TNF (Khisti e Chopde, 2000). O DOI tem um potencial como antidepressivo, pelo menos agudamente, pelo fato de que em microdiálise, tanto em ratos quanto em camundongos, aumenta a liberação de serotonina na região do córtex pré-frontal medial, uma região envolvida na fisiopatologia da depressão (Artigas, 2002). Este efeito agudo poderia justificar o efeito sinérgico do cloreto de zinco com o DOI no TNF. Além disso, a administração de DOI causa um efeito ansiolítico em ratos (Hawkins et al., 2002) e está bem relatado que muitos compostos dotados de ação ansiolítica também possuem ação antidepressiva (File, 1996; Waugh e Goa, 2003; Stocchi et al., 2003). Também é sugerido na literatura que a administração DOI em ratos causa a dessensibilização de receptores 5-HT<sub>1A</sub> hipotalâmicos (Zhang et al., 2001). Deve-se também considerar que os inibidores da NOS aumentam a liberação de 5-HT no córtex pré-frontal (Wegener et al., 2000). Considerando que o cloreto de zinco exerce um efeito antidepressivo no TNF, ao menos em parte, pelo seu efeito inibitório sobre a atividade da NOS, uma possibilidade é de que o efeito do cloreto de zinco sobre os receptores 5-HT<sub>2A</sub> poderia indiretamente aumentar o nível de 5-HT na fenda sináptica. Entretanto esta hipótese necessita futuros estudos.

Neste estudo o pré-tratamento com ioimbina foi capaz de reverter completamente a ação antidepressiva do cloreto de zinco, demonstrando um provável envolvimento dos

receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no efeito do cloreto de zinco no TNF. Este resultado é semelhante ao observado com a agmatina, cujo efeito antidepressivo também foi revertido por este antagonista e que, assim como o zinco, exerce uma ação antidepressiva, ao menos em parte, por inibir os receptores NMDA (Zomkowski et al., 2002). O zinco poderia então, estar promovendo a ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, assim como é proposto para o efeito antidepressivo da agmatina (Zomkowski et al., 2002) e da clonidina (O'Neill et al., 2001). O envolvimento destes receptores na fisiopatologia da depressão pode ser inferido pelo fato de que os antagonistas de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos possuem um maior efeito em indivíduos com depressão do que em indivíduos normais, aumentando a atividade do eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA), o que sugere uma hiper-sensibilidade dos receptores  $\alpha_2$ -pós-sinápticos em indivíduos deprimidos (Price et al., 1986).

O prazosim, um antagonista de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos também foi capaz de reverter o efeito do cloreto de zinco no TNF, indicando que este subtipo de receptor também é importante no mecanismo de ação do cloreto de zinco. Um resultado similar foi encontrado por Rodrigues et al. (2002) que mostraram a reversão do efeito antidepressivo do extrato de *Siphocampylus verticillatus* pelo prazosim no TNF em camundongos. Além disso, o tratamento com choque eletroconvulsivo repetido aumenta consistentemente a densidade dos sítios de *binding* de [ $H^3$ ]prazosim e a estimulação do fosfato de inositol no córtex, embora o tratamento com desipramina não produza o mesmo efeito (Mongeau et al., 1997). Existem ainda outras evidências de que os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos estão envolvidos na ação de antidepressivos. A administração crônica de mirtazipina (inibidor dual da recaptação de NA e 5-HT) ou reboxetina (ISRN sem nenhuma afinidade por receptores de neurotransmissores) aumenta a responsividade comportamental (locomoto e agressividade) dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Rogoz et al., 2002; Rogoz e Kolasiewicz, 2001) e a administração de imipramina ou choque eletroconvulsivo também produz um aumento da expressão dos



receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos no córtex pré-frontal e no hipocampo (Nalepa et al., 2002). Nossos dados sugerem uma importante participação dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos e  $\alpha_2$ -adrenérgicos no efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF.

A reversão do efeito antidepressivo do cloreto de zinco pelo pré-tratamento com naloxona, um antagonista de receptores opióides, indica que o sistema opióide está implicado ao menos em parte neste efeito. Os opióides endógenos têm sido implicados nos transtornos depressivos, tendo em vista que foi encontrado um aumento no número de receptores opióides no SNC de vítimas de suicídios com depressão (Gross-Isseroff et al., 1990; Gabilondo et al., 1995). Além disso, também foi demonstrado níveis altos de opióides endógenos e de seus receptores em áreas límbicas envolvidas na regulação do humor (Waksman et al., 1986). A melhora do humor induzida por alguns antidepressivos parece ser relacionada com a regulação do sistema opióide (Isenberg e Cícero, 1984; Hamon et al., 1987). De fato, vários antagonistas opióides são capazes de reverter os efeitos de antidepressivos efetivos clinicamente em testes animais de depressão (Martin et al., 1986; Tejedor-Real et al., 1995). Além disso, o pré-tratamento com naloxona reverte o efeito antidepressivo do extrato hidroalcoólico de *Siphocampylus verticillatus* no teste da suspensão da cauda em camundongos (Rodrigues et al., 2002). Outro estudo mais recente mostrou que a administração do antagonista de receptores kappa-opiíides nor-binaltorfimina, produz um efeito antidepressivo no TNF (Mague et al., 2003). Assim embora seja necessária uma investigação futura para determinar os subtipos de receptores opióides envolvidos no efeito antidepressivo do cloreto de zinco, este estudo também mostra a participação do sistema opióide no seu efeito no TNF.

Através do pré-tratamento com cafeína, um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, foi possível demonstrar que os receptores para adenosina estão também, ao menos em parte, envolvidos no efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF. De fato, algum

envolvimento deste sistema na depressão já foi descrito na literatura. A adenosina produziu efeito depressivo no modelo do desamparo aprendido (Minor et al., 1994). Também foi mostrado que antagonistas de receptores  $A_{2A}$  são dotados de ação antidepressiva (El Yacoubi et al., 2001), embora os antagonistas de receptores  $A_{2A}$  causem um aumento na locomoção de camundongos (El Yacoubi, 2000). Recentemente também foi demonstrado que a função do receptor  $A_{2A}$  está comprometida em plaquetas de pacientes com depressão maior (Berk et al., 2001). Dados recentes do nosso laboratório demonstram que a adenosina e os agonistas de receptores  $A_1$  e  $A_2$  de adenosina produzem um efeito antidepressivo no TNF em camundongos (Kaster et al., 2003). Os receptores de adenosina modulam a atividade dos receptores NMDA, uma vez que os antagonistas de receptores  $A_1$  podem agir indiretamente para aumentar a ativação direta dos receptores NMDA (De Mendonça e Ribeiro, 1993; Klishin et al., 1994), e como já foi descrito neste estudo, existe o envolvimento dos receptores NMDA no efeito antidepressivo do cloreto de zinco. A própria adenosina inibe a liberação de glutamato, um efeito que pode ser prevenido pela administração de antagonistas de receptores de adenosina do tipo  $A_1$  (Zoccarato et al., 2001). Então é possível que a cafeína antagonize o efeito antidepressivo do cloreto de zinco no TNF tanto de maneira direta, bloqueando os receptores de adenosina, como indiretamente, através da modulação dos receptores NMDA e da liberação de glutamato. Através dos resultados deste trabalho podemos inferir que o efeito antidepressivo do cloreto de zinco pode ser modulado por receptores de adenosina, embora se necessite mais trabalhos para identificar qual o subtipo de receptor que pode modular este efeito e como ele ocorre.

## Conclusão

Este trabalho confirmou os dados prévios existentes na literatura que demonstram que a administração de zinco na forma de sulfato e hidroaspartato via i.p. exerce um efeito antidepressivo em camundongos submetidos ao TNF (Krocza et al., 2000, 2001), e estende estes dados demonstrando que a administração de zinco na forma de cloreto via i.p. também exerce um efeito antidepressivo em animais submetidos ao TSC. Além disso, este estudo mostra que a administração central de cloreto de zinco via i.c.v. também produz um efeito antidepressivo em camundongos. Com este estudo podemos concluir também que este efeito antidepressivo do cloreto de zinco envolve vários sistemas de neurotransmissores como o sistema glutamatérgico, via receptores NMDA e a via da L-arginina-óxido nítrico, o sistema adrenérgico via receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ -adrenérgicos, o sistema serotoninérgico via receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, o sistema opióide e da adenosina.

Foi possível ainda concluir que o cloreto de zinco em uma dose inativa no TNF pode modular de alguma forma os receptores NMDA, revertendo o efeito antidepressivo de drogas que agem inibindo este receptores, mas não o efeito antidepressivo de drogas com ação primária no sistema monoaminérgico, como a imipramina e fluoxetina. Desta forma, o zinco pode ser uma ferramenta útil para investigações futuras a respeito do mecanismo de ação de drogas antidepressivas.

Além disto, este trabalho confirmou que o zinco é capaz de potencializar o efeito antidepressivo da imipramina no TNF (Krocza et al., 2001), e mostrou que também ocorre uma potencialização do efeito antidepressivo da fluoxetina com o zinco, o que pode ser de extremo valor terapêutico se estes efeitos forem comprovados também em humanos.

## Referências bibliográficas

- American Psychiatry Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. Washington, DC, 4<sup>a</sup> ed., 1994.
- Angst, J. Epidemiology of depression. **Psychopharmacology**, v. 106, p. S71-S74, 1992.
- Artigas, F., Celada, P., Laruelle, M., Adell, A. How does pindolol improve antidepressant action? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 224-228, 2001.
- Artigas, F. Modulation of the activity of prefrontal circuits by 5-HT<sub>2A</sub>/5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 12, p. S166, 2002.
- Bai, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom T, Skolnick P. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 70, p. 187-192, 2001.
- Baldessarini, R.J. Drugs and treatment of psychiatry disorders - depression and mania. Em: Limird, L.E., Hardman, J.G., **Goodman & Gilman's the Pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 431-459.
- Barañano, D.E., Ferris, C.D., Snyder, S.H. Atypical neural messengers. **Trends Neurosci.**, v. 24, p. 99-106, 2001.
- Berk, M., Plein, H., Ferreira, D., Jersky, B. Blunted adenosine A2a receptor function in platelets in patients with major depression. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 11, p. 183-186, 2001.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S., Krystal, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol. Psychiatry**, v. 47, p. 351-354, 2000.
- Beyersmann, D., Haase, H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. **Biometals**, v. 14, p. 331-341, 2001.
- Blier, P., de Montigny, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 15, p. 220-226, 1994.
- Borsini, F., Meli, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v. 94, p. 147-161, 1988.
- Bush, A.I. The metallobiology of Alzheimer's disease. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 207-214, 2003.
- Callado, L.F., Hopwood, S.E., Hancock, P.J., Stamford, J.A. Effects of dizocilpine (MK 801) on noradrenaline, serotonin and dopamine release and uptake. **NeuroReport**, v. 11, p. 173-176, 2000.

- Castagnoli, K., Palmer, S., Castagnoli, N Jr. Neuroprotection by (R)-deprenyl and 7-nitroindazole in the MPTP C57BL/6 mouse model of neurotoxicity. **Neurobiology**, v. 7, p. 135-149, 1999.
- Cervo, L., Samanin, R. Potential antidepressant properties of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a selective serotonin1A receptor agonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 144, p. 223-229, 1987.
- Charney, D.S. Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. **J. Clin. Psychiatry.**, v. 14, p.11-14, 1998.
- Choi, D.W., Koh, J.Y. Zinc and brain injury. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 21, p. 347-375, 1998.
- Choi, Y., Chen, H., Lipton, A.S. Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn<sup>2+</sup> modulation of the NMDA receptor. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 392-400, 2001.
- Christine, C.W., Choi, D.W. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 108-116, 1990.
- Chuang, D.M., Chen, R.W., Chalecka-Franaszek, E., Ren, M., Hashimoto, R., Senatorov, V., Kanai, H., Hough, C., Hiroi, T., Leeds, P. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. **Bipolar Disord.**, v. 4, p. 129-136, 2002.
- Claustre, Y., Rouquier, L., Serrano, A., Benavides, J., Scatton, B. Effect of the putative 5-HT1A receptor antagonist NAN-190 on rat brain serotonergic transmission. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 204, p. 71-77, 1991.
- Contestabile, A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. **Brain Res. Rev.**, v. 32, p. 476-509, 2000.
- Cordás, T.A. **Depressão: da bile negra aos neurotransmissores (uma introdução histórica)**. 1. ed. São Paulo: Lemos editorial, 2002. p. 13-28.
- Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 23, p. 238-245, 2002.
- Da Silva, G.L., Mateussi, A.S., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., Rodrigues, A.L.S. Evidence for a dual effect of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. **NeuroReport**, v. 11, p. 3699-3702, 2000.
- D' Aquila, P.S., Collu, M., Gessa, G.L., Serra, G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressants drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 405, p. 365-373, 2000.
- De Mendonça, A., Ribeiro, J.A. Adenosine inhibits the NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic potential in the hippocampus. **Brain Res.**, v. 606, p. 351-356, 1993.

- Dominguez, M.I., Blasco-Ibañez, J.M., Crespo, C., Marques-Mari, A.I., Martinez-Guijarro, F.J. Zinc chelation during non-lesioning overexcitation results in neuronal death in the mouse hippocampus. **Neuroscience**, v. 116, p. 791-806, 2003.
- Du, L., Bakish, D., Lapierre, Y.D., Ravindran, A.V., Hrdina, P.D. Association of polymorphism of serotonin 2A receptor gene with suicidal ideation in major depressive disorder. **Am. J. Med. Genet.**, v. 96, p. 56-60, 2000.
- Eckeli, A.L., Dach, F., Rodrigues, A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. **NeuroReport**, v. 11, p. 839-843, 2000.
- Elgün, S., Kumbasar, H. Increased serum arginase activity in depressed patients. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 24, p. 227-232, 2000.
- El Yacoubi, M., Ledent, C., Parmentier, M., Bertorelli, R., Ongini, E., Costentin, J., Vaugeois, J.M. Adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A<sub>2A</sub> receptor knockout mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, p. 68-77, 2001.
- El Yacoubi, M., Ledent, C., Parmentier, M., Costentin, J., Vaugeois, J. SCH 58261 and ZM 241385 differentially prevent the motor effects of CGS 21680 in mice: evidence for a functional 'atypical' adenosine A(2A) receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 401, p. 63-77, 2000.
- Engelhard, K., Werner, C., Eberspächer, E., Bachl, M., Blobner, M., Hildt, E., Hutzler, P., Kochs, E. The Effect of the  $\alpha_2$ -Agonist dexmedetomidine and the *N*-Methyl-D-Aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. **Anesth. Analg.**, v. 96, p. 524-531, 2003.
- Espejo, E.F., Miñano, F.J. Prefrontocortical dopamine depletion induces antidepressant-like effects in rats and alters the profile of desipramine during Porsolt's test. **Neuroscience**, v. 88, p. 609-615, 1999.
- Eroglu, L., Caglayan, B. Anxiolytic and antidepressant properties of methylene blue in animal models. **Pharmacol. Res.**, v. 36, p. 381-385, 1997.
- File, S.E. Recent developments in anxiety, stress, and depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54, p. 2-12, 1996.
- Fleck, M.P.A., Lafer, B., Sougey, F.B., Del Porto, J.A., Brasil, M.A., Juruena, M.F. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). **Rev. Bras. Psiqu.**, v. 25, p. 114-122, 2003.
- Gabilondo, A.M., Meana, J.J., Garcia-Sevilla, J.A. Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. **Brain Res.**, v. 682, p. 245-250, 1995.
- Goodwin, F.K., Jamison, K.R. **Maniac-depressive illness**. 1.ed. New York: Oxford University Press. 1990.

- Gozlan, H., Ben-Ari, Y. NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 16, p. 368-374, 1995.
- Gross-Isseroff, R., Dillon, K.A., Israeli, M., Biegon, A. Regionally selective increases in mu-opioid receptor density in the brains of suicide victims. **Brain Res.**, v. 530, p. 312-316, 1990.
- Gulley, J.M., Rebec, G.V. Modulatory effect of ascorbate, alone or with haloperidol, on a lever-released conditioned avoidance response task. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 63, p. 125-129, 1999.
- Gupta, R.K., Tiller, J.W., Burrows, G.D. Dual action antidepressants and some important considerations. **Aust. N. Z. J. Psychiatry**, v. 37, p. 190-195, 2003.
- Hamon, M., Gozlan, H., Bourgoin, S., Benoliel, J.J., Mauborgne, A., Taquet, H., Cesselin, F., Mico, J.A. Opioid receptors and neuropeptides in the CNS in rats treated chronically with amoxapine or amitriptyline. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 531-539, 1987.
- Harkin, A.J., Bruce, K.H., Craft, B., Paul, I.A. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice 1. Acute treatments are active in the forced swim test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 372, p. 207-213, 1999.
- Harkin, A.J., Connor, T.J., Walsh, M., St John, N., Kelly, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 44, p. 616-623, 2003.
- Hawkins, M.F., Uzelac, S.M., Baumeister, A.A., Hearn, J.K., Broussard, J.I., Guillot, T.S. Behavioral responses to stress following central and peripheral injection of the 5-HT(2) agonist DOI. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 73, p. 537-544, 2002.
- Heiberg, I.L., Wegener, G., Rosenberg, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 134, p. 479-484, 2002.
- Hjorth, S., Sharp, T. Mixed agonist/antagonist properties of NAN-190 at 5-HT1A receptors: behavioural and in vivo brain microdialysis studies. **Life Sci.**, v. 46, p. 955-963, 1990.
- Horning, M.S., Blakemore, L.J., Trombley, P.Q. Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine. **Brain Res.**, v. 852, p. 56-61, 2000.
- Howell, G. A., Welch, M. G., Frederickson, C. J. Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. **Nature**, v. 308, p. 736-738, 1984.
- Isenberg, K.E., Cícero, T.J. Possible involvement of opiate receptors in the pharmacological profiles of antidepressant compounds. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 103, p.57-63, 1984.

- Isenberg, K.E., Zorumski, C.F. Eletroconvulsive therapy. In: Kaplan and Sadock' s Comprehensive Textbook of Psychiatry, 2000. Philadelphia: Lippincott Williams and Williams. CD-ROM for windows.
- Javitt, D.C., Zukin, S.R. Biexponential kinetics of [3H]MK-801 binding:evidence for access to closed and open *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. **Mol. Pharmacol.**, v. 35, p. 387-393, 1989.
- Kaster, M.P., Rosa, A.O., Rosso, M. M., Goulart, E.C., Santo, A.R.S., Rodrigues, A.L.S. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. **Neurosci. Lett.**, 2003 (no prelo).
- Khisti, R.T., Chopde, C.T. Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one in mice. **Brain Res.**, v. 865, p. 291-300, 2000.
- Kitamura, Y., Nagatani, T. Buspirone enhances immobility in the forced swim test in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 55, p. 445-451, 1996.
- Klishin, A., Lozovaya, N. and Krishtal, O. Persistently enhanced ratio of NMDA and non NMDA components of rat hippocampal EPSC after block of A1 adenosine receptors at increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>/[Mg<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>. **Neurosci. Lett.**, v. 179, p. 132-136, 1994.
- Koh, J.Y., Choi, D.W. Zinc toxicity on cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. **Neuroscience**, v. 60, p. 1049-1057, 1994.
- Krocicka, B., Branski, P., Palucha, A., Pilc, A., Nowak, G. Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test. **Brain Res. Bull.**, v. 55, p. 297-300, 2001.
- Krocicka, B., Zieba, A., Dudek, D., Pilc, A., Nowak, G. Zinc exhibits an antidepressant-like effect in forced swimming test in mice. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 52, p. 403-406, 2000.
- Kudoh, A., Takahira, Y., Katagai, H., Takazawa, T. Small-dose ketamine improves the postoperative state of depressed patients. **Anesth. Analg.**, v. 95, p. 114-118, 2002.
- Kumar, A., Mintz, A., Bilker, W., Gottlieb, G. Autonomous neurobiological pathways to late-life major depressive disorder: clinical and pathophysiological implications. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. 229-236, 2002.
- Lafer, B., Renshaw, P.E., Sachs, G. Depressão e os gânglios da base. Em: **Neuropsiquiatria dos gânglios da base**. Miguel, E.C., Rauch, S.L., Lackman, J.F. 1. ed. São Paulo: Lemos Editorial & Gráficos Ltd., 1998.
- Lengyel, I., Fieuw-Makaroff, S., Hall, A.L., Sim, A.T. R., Rostas, J.A. P., Dunkley, P.R. Modulation of the phosphorylation and activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by zinc. **J. Neurochem.**, v. 75, p. 594-605, 2000.



- Levine, J., Panchalingam, K., Rapoport, A., Gershon, S., McClure, R.J., Pettegrew, J.W. Increased Cerebrospinal Fluid Glutamine Levels in Depressed Patients. **Biol. Psychiatry**, v. 47, p. 586-593, 2000.
- Luscombe, G.P., Martin, K.F., Hutchins, I.J., Gosden, J., Heal, D.J. Mediation of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 108, p. 660-677, 1993.
- MacGillivray, S., Arroll, B., Hatcher, S., Ogston, S., Reid, I., Sullivan, F., Williams, B., Crombie, I. Efficacy and tolerability of selective serotonin reuptake inhibitors compared with tricyclic antidepressants in depression treated in primary care: systematic review and meta-analysis. **Br. Med. J.**, v. 326, p. 1014-1020, 2003.
- MacLoughlin, I.J., Hodge, J.S. Zinc in depressive disorder. **Acta Psychiatr. Scand.**, v. 82, p. 451-453, 1990.
- Maes, M., D'Haese, P.C., Scharpe, S., D'Hondt, P., Cosyns, P., De Broe, M.E. Hypozincemia in depression. **J. Affect. Disord.**, v. 31, p. 135-140, 1994.
- Maes, M., Vandoolaeghe, E., Neels, H., Demedts, P., Wauters, A., Meltzer, H.Y., Altamura, C., Desnyder, R. Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune-inflammatory response in that illness. **Biol. Psychiatry**, v. 42, p. 349-358, 1997.
- Maes, M., De Vos, N., Demedts, P., Wauters, A., Neels, H. Lower serum zinc in major depression in relation to changes in serum acute phase proteins. **J. Affect. Disord.**, v. 56, p. 189-194, 1999.
- Mague, S.D., Pliakas, A.M., Todtenkopf, M.S., Tomasiewicz, H.C., Zhang, Y., Stevens Jr, W.C., Jones, R.M., Portoghese, P.S., Carlezon Jr, W.A. Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, p. 323-330, 2003.
- Majewska, M.D., Bell, J.A., London, E.D. Ascorbic acid protects neurons from injury produced by glutamate and NMDA. **Neuroreport**, v. 1, p.194-196, 1990a.
- Majewska, M.D., Bell, J.A., London, E.D. Regulation of NMDA receptors by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate. **Brain Res.**, v. 537, p. 328-332, 1990b.
- Malcon, C., Achaval, M., Komlos, F., Partata, W., Sauregg, M., Ramirez, G. GMP protects against quinolinic acid-induced loss of NADPH-diaphorase-positive cells in the rat striatum. **Neurosci. Lett.**, v. 225, p.145-148, 1997.
- Manji, H.K., Drevets, W.C., Charney, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nature Med.**, v. 7, p. 541-547, 2001.
- Mann, J.J., Malon, E.K.M., Diehl, D.J., Perel, J., Coopre, T.B., Mintun, M.A. Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. **Am. J. Psych.**, v. 153, p. 174-181, 1996.

- Mantovani, M., Pertile, R., Calixto, J.B., Santos, A.R., Rodrigues, A.L. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci. Lett.**, v. 343, p. 1-4, 2003.
- Martin, P., Soubrie, P., Simon, P. Noradrenergic and opioid mediation of tricyclic-induced reversal of escape deficits caused by inescapable shock pretreatment in rats. **Psychopharmacology**, v. 90, p. 90-94, 1986.
- Matos e Sousa, F.G. de. Tratamento da depressão. **Rev. Bras. Psiqu.**, v. 21, p. SI18-SI23, 1999.
- Maubach, K.A., Rupniak, N.M.J., Kramer, M.S., Hill, R.G. Novel strategies for pharmacotherapy of depression. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 3, p. 481-488, 1999.
- Melena, J., Chidlow, G., Osborne, N.N. Blockade of voltage-sensitive Na(+) channels by the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT: possible significance for neuroprotection. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 406, p. 319-324, 2000.
- Middlemiss, D.N., Price, G.W., Watson, J.M. Serotonergic targets in depression. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 2, p.18-22, 2002.
- Minor, T.R., Winslow, J.L., Chang, W.C. Stress and adenosine: II. Adenosine analogs mimic the effect of inescapable shock on shuttle-escape performance in rats. **Behav. Neurosci.**, v. 108, p. 265-276, 1994.
- Mittal, C.K., Harrel, W. B. Mehta, C.S. Interaction of heavy metal toxicants with brain constitutive nitric oxide synthase. **Mol. Cell Biochem.**, v. 149-150, p. 263-265, 1995.
- Mongeau, R., Blier, P., de Montigny, C. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. **Brain Res. Rev.**, v. 23, p. 145-195, 1997.
- Mora, A., González-Polo, R.A., Fuentes, J.M., Soler, G., Centeno, F. Different mechanisms of protection against apoptosis by valproate and Li<sup>+</sup>. **Eur. J. Biochem.**, v. 266, p. 886-891, 1999.
- Moser, P.C., Sanger, D.J. 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonists neither potentiate nor inhibit the effects of fluoxetine and biefloxatone in the forced swim test in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 372, p. 127-134, 1999.
- Musselman, D.L., Evans, D.L., Nemeroff, C.B. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. **Arch. Gen. Psych.**, v. 55, p. 580-592, 1998.
- Nalepa, I., Kreiner, G., Kowalska, M., Sanak, M., Zelek-Molik, A., Vetulani, J. Repeated imipramine and electroconvulsive shock increase alpha1A-adrenoceptor mRNA level in rat prefrontal cortex. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 444, p. 151-159, 2002.

- Narang, R.L., Gupta, K.R., Narang, A.P., Singh, R. Levels of copper and zinc in depression. **Ind. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 35, p. 272-274, 1991.
- Nemeroff, C.B., Owens, M.J. Treatment of mood disorders. **Nature Neurosci.**, v. 5, p. 1068-1070, 2002.
- Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, p.13-25, 2002.
- Nowak, G., Szewczyk, B., Sadlik, K., Piekoszewski, W., Trela, F., Florek, E., Pilc, A. Reduced potency of zinc to interact with NMDA receptors in hippocampal tissue of suicide victims. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 55, p. 455-459, 2003a.
- Nowak, G., Szewczyk, B., Wieronska, J.M., Branski, P., Palucha, A., Pilc, A., Sadlik, K., Piekoszewski, W. Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. **Brain Res. Bull.**, v. 61, p.159-164, 2003b.
- Nowak, G., Schelegel-Zawadzka, M. Alterations in serum and brain trace element levels after antidepressant treatment: part I. Zinc. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 67, p. 85-92, 1999.
- Olmos, G., DeGregorio-Rocasolano, N., Paz-Regalado, M., Gasull, T., Assumpcio-Boronat, M., Trullas, R., Villarroel, A., Lerma, J., Garcia-Sevilla, J.A. Protection by imidazoline drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, p. 1317-1326, 1999.
- O' Neill, M.F., Conway, M.W. Role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B) receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 391-398, 2001.
- O' Neill, M.F., Osborne, D.J., Woodhouse, S.M., Conway, M.W. Selective imidazoline I2 ligands do not show antidepressant-like activity in the forced swim test in mice. **J. Psychopharmacol.**, v.15, p.18-22, 2001.
- Page, M.E., Detke, M.J., Dalvi, A., Kirby, L.G., Lucki, I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. **Psychopharmacology**, v.147, p.162-167. 1999.
- Palmiter, R. D., Cole T. B., Quaife C. J., Findley S. D. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 14934-14939, 1996.
- Park, J.A., Koh, J. Induction of an immediate early gene *egr-1* by zinc through extracellular signal-regulated kinase activation in cortical culture: its role in zinc-induced neuronal death. **J. Neurochem.**, v. 73, p. 450-456, 1999.
- Petrie, R.X.A, Reid. I.C., Stewart, C.A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. A critical review. **Pharmacol. Ther.**, v. 87, p. 11-25, 2000.

- Popoli, M., Brunello, N., Perez, J., Racagni, G. Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs **J. Neurochem.**, v. 74, p. 21-33, 2000.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharm. Ther.**, v. 229, p. 327–336, 1977.
- Price, L.H., Charney, D.S., Rubin, A.L., Heninger, G.R. Alpha 2-adrenergic receptor function in depression. The cortisol response to yohimbine. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 43, p. 849-858, 1986.
- Proescholdt, M., Heimann, A., Kempfski, O. Neuroprotection of S(+) ketamine isomer in global forebrain ischemia. **Brain Res.**, v. 904, p. 245-251, 2001.
- Rampello, L., Nicoletti, F., Nicolletti, F. Dopamine and depression. Therapeutic implications. **CNS Drugs**, v. 13, p. 36-45, 2000.
- Redrobe, J.P., Bourin, M. Partial role of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 325, p. 129-135, 1997.
- Redrobe, J.P., Bourin, M. Clonidine potentiates the effects of 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2A/2C</sub> antagonists and 8-OH-DPAT in the mouse forced swimming test. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 8, p. 169-173, 1998.
- Redrobe, J.P., MacSweeney, C.P., Bourin, M. The role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 318, p. 213-220, 1996.
- Regner, A., Ramírez, G., Bello-Klein, A., Souza, D.O. Effects of guanine nucleotides on glutamate-induced chemiluminescence in rat hippocampal slices submitted to hypoxia. **Neurochem. Res.**, v. 23, p. 519-524, 1998.
- Ressler, K.J., Nemeroff, C.B. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. **Biol. Psychiatry**, v. 46, p. 1219-1233, 1999.
- Ressler, K.J., Nemeroff, C.B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. **Depress. Anxiety**, v. 12, p.: 2-19, 2000.
- Rice, M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends Neurosci.**, v. 23, p. 209-216, 2000.
- Rodrigues, A.L.S., Rocha, J.B.T., Mello, C.F., Souza, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 79, p. 150-156, 1996.
- Rodrigues, A.L.S., da Silva, G., Mateussi, A.S., Fernandes, E.F., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., Santos, A.R.S. Involvement of monoaminergic system in the

- antidepressant-like effect of hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.**, v. 70, p. 1347-1458, 2002.
- Rogoz, Z., Kolasiewicz, W. Effect of repeated treatment with reboxetine on the central alpha1-adrenergic system. **Pol. J. Pharmacol.**, v.53, p. 663-667, 2001.
- Rogoz, Z., Wrobel, A., Dlaboga, D., Maj, J., Dziedzicka-Wasylewska, M. Effect of repeated treatment with mirtazapine on the central alpha1-adrenergic receptors. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 53, p. 105-116, 2002.
- Rudorfer, M.V., Potter, W.Z. Antidepressants: a comparative review of the clinical pharmacology and therapeutic use of the ' newer' versus the ' older' **Drugs**, v. 37, p. 713-738, 1989.
- Sanchez, V., Camarero, J., Esteban, B., Peter, M.J., Green, A.R., Colado, M.I. The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA (' ecstasy' )-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 134, p. 46-57, 2001.
- Sawynok, J., Esser, M.J., Reid, A.R. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 26, p. 21-29, 2001.
- Schmidt, A.P., Lara, D.R., Maraschin, J.D., Perla, A.D., Souza, D.O. Guanosine and GMP prevents seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Res.**, v. 864, p. 40-43, 2000.
- Sheline, Y.I., Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G., Vannier, M.W. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, 3908-3913, 1996.
- Schramm, N.L., McDonald, M.P., Limbird, L.E. The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 4875-4882, p. 2001.
- Schreiber, S., Bleich, A., Pick, C.G. Venlafaxine and mirtazapine: different mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive effects - a possible opioid involvement in severe depression? **J. Mol. Neurosci.**, v. 18, p. 143-149, 2002.
- Sibille, E., Sarnyai, Z., Benjamin, D., Gal, J., Baker, H., Toth, M. Antisense inhibition of 5-hydroxytryptamine2a receptor induces an antidepressant-like effect in mice. **Mol. Pharmacol.**, v. 52, p.1056-1063, 1997.
- Skolnick, P. Antidepressants for the new millenium. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 375, p. 31-40, 1999.
- Skolnick, P. Modulation of glutamate receptors: Strategies for the development of novel antidepressants. **Amino Acids**, v. 23, p. 153-158, 2002.

- Sleath, B., Wurst, K., Lowery, T. Drug information sources and antidepressant adherence. **Comm. Men. Health**, v. 39, p. 359-368, 2003.
- Smith, J.C., Whitton, P.S. Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. **Neurosci. Lett.**, v. 291, p. 5-8, 2000.
- Soares, J.C., Mann, J.J. The functional neuroanatomy of mood disorders. **J. Psychiatr. Res.**, v. 31, p. 393-432, 1997.
- Spiegel, R. **Psychopharmacology: an introduction**. 3.ed. England: John Wiley & Sons, 1996.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367-370, 1985.
- Stocchi, F., Nordera, G., Jokinen, R.H., Lepola, U.M., Hewett, K., Bryson, H., Iyengar, M.K. Efficacy and tolerability of paroxetine for the long-term treatment of generalized anxiety disorder. **J. Clin. Psychiatry.**, v. 64, p. 250-258, 2003.
- Suzuki, E., Yagi, G., Nakaki, T., Kanba, S., Asai, M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. **J. Affect. Disord.**, v. 63, p. 221-224, 2001.
- Szewczyk, B., Kata, R., Nowak, G. Rise in zinc affinity for the NMDA receptor evoked by chronic imipramine is species-specific. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 53, p. 641-645, 2001.
- Takeda, A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. **Brain Res. Rev.**, v. 34, p. 137-148, 2000.
- Tanda, G., Carboni, E., Frau, R., Di Chiara, G. Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? **Psychopharmacology**, v. 115, p. 285-288, 1994.
- Tanda, G., Bassareo, V., Di Chiara, G. Mianserin markedly and selectively increases extracellular dopamine in the prefrontal cortex as compared to the nucleus accumbens of the rat. **Psychopharmacology**, v. 123, p. 127-130, 1996.
- Tejedor-Real, P., Mico, J.A., Maldonado, R., Roques, B.P., Gibert-Rahola, J. Implication of endogenous opioid system in the learned helplessness model of depression. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 52, p. 145-152, 1995.
- Terse, P.S., Komiskey, H.L. Modulation a competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist binding by zinc oxide. **Brain Res.**, v. 744, p. 347-350, 1997.
- Thierry, B., Steru, L., Simon, P., Porsolt, R.D. The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacology**, v. 90, p. 284-285, 1986.
- Van Oekelen, D., Luyten, W.H., Leysen, J.E. 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors and their atypical regulation properties. **Life Sci.** v. 72, p. 2429-2449, 2003.

- Volke, V., Wegener, G., Bourin, M., Vasar, E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. **Behav. Brain Res.**, v. 140, p. 141-147, 2003.
- Von Knorring, L., Perris, C., Oreland, L., Eisemann, M., Eriksson, U., Perris, H. Pain as a symptom in depressive disorders and its relationship to platelet <sup>3</sup>H-imipramine binding, 5-HT uptake and 5-HT content in major depressive disorder. **J. Affect. Disord.**, v. 20, p. 101-113, 1984.
- Waksman, G., Hamel, E., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P. Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of mu and delta opioid receptors in rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 1523-1527, 1986.
- Waugh, J., Goa, K.L. Escitalopram: a review of its use in the management of major depressive and anxiety disorders. **CNS Drugs**, v.17, p. 343-362, 2003.
- Wegener, G., Volke, V., Rosenberg, R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, p. 575-580, 2000.
- Wegener, G., Volke, V., Harvey, B.H., Rosenberg, R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. **Brain Res.**, v. 959, p. 128-134, 2003.
- Weissman, M.M., Leaf, P.J., Tischler, G.L., Blazer, D.G., Karno, M., Bruce, M.L., Florio, L.P. Affective disorders in United States communities. **Psychol. Med.**, v. 18, p. 141-153, 1988.
- Wenzel, H. J., Cole, T. B., Born, D. E., Schwartzkroin, P. A., Palmiter, R. D. Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 12676-12681, 1997.
- Wieland, S., Lucki, I. Antidepressant-like activity of 5-HT<sub>1A</sub> agonists measured with the forced swim test. **Psychopharmacology**, v. 101, p. 497-504, 1990.
- Willner, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, p. 1-16, 1984.
- Wong, M., Licinio, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 343-351, 2001.
- Yildiz, F., Erden, B.F., Ulak, G., Utkan, Y., Gacar, N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in forced swimming test in rats. **Psychopharmacology**, v. 149, p. 41-44, 2000.

- Yoshio, R., Taniguchi, T., Itoh, H., Muramatsu, I. Affinity of serotonin receptor antagonists and agonists to recombinant and native alpha1-adrenoceptor subtypes. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 86, p.189-195, 2001.
- Zhang, Y., D'Souza, D., Raap, D.K., Garcia, F., Battaglia, G., Muma, N.A., Van de Kar, L.D. Characterization of the functional heterologous desensitization of hypothalamic 5-HT1A receptors after 5-HT2A receptor activation. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 7919-7927, 2001.
- Zoccarato, F., Cavallini, L., Alexandre, A. Adenosine inhibits glutamate exocytosis largely without interfering with Ca<sup>2+</sup> influx in rat cerebrocortical synaptosomes. **Neurosci. Lett.**, v. 309, p. 181-184, 2001.
- Zomkowski, A.D.E., Hammes, L., Lin, J., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **NeuroReport**, v. 13, p. 387-391, 2002.