

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**

Ágatha Oliveira

**A TERAPIA COMBINADA DE EXERCÍCIO FÍSICO E
CREATINA INDUZ EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E
AUMENTO DE BDNF NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

**Florianópolis
Janeiro/2014**

Ágatha Oliveira

**A TERAPIA COMBINADA DE EXERCÍCIO FÍSICO E
CREATINA INDUZ EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E
AUMENTO DE BDNF NO HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Nelson H. Gabilan

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues

**Florianópolis
2014**

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

Oliveira, Ágatha

A terapia combinada de exercício físico e creatina induz efeito tipo-antidepressivo e aumento de BDNF no hipocampo de camundongos. / Ágatha Oliveira ; orientador, Nelson Horacio Gabilan ; co-orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues. - Florianópolis, SC, 2014.

89 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Creatina. 3. Exercício Físico. 4. Depressão. 5. BDNF. I. Gabilan, Nelson Horacio. II. Rodrigues, Ana Lúcia Severo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

“A terapia combinada de exercício físico e creatina induz efeito tipo-antidepressivo e aumento de BDNF no hipocampo de camundongos”

por

Ágatha Oliveira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 01/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

Prof(a) Dr(a) Nelson Horácio Gabilan (Orientadora/BQA/CCB/UFSC)

Banca Examinadora:

Prof(a) Dr(a) Luiz Fernando Freire Royes (CEFD/UFSC)

Prof(a) Dr(a) Geison Souza Izídio (BEG/CCB/UFSC)

Prof(a) Dr(a) Carla Inês Tasca (BQA/CCB/UFSC)

Coordenação do Programa:

Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 30 de janeiro de 2014.

“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.”

— *Marie Curie*

Agradeço...

A toda a minha família, especialmente a minha mãe Ariâny, exemplo de mulher batalhadora que coloca muito amor em cada coisa que realiza, e meu pai Pércio, pai dedicado e com um dos maiores corações que já conheci, por sempre acreditarem em mim mesmo nas horas e fases em que eu achava que não era capaz, por me darem apoio a distancia quando eu achava que a saudade pesava mais que a vontade de continuar, pelos ensinamentos de amor durante toda a minha vida que me fizeram chegar onde estou hoje. Amo muito vocês.

À minha lindermã Tainah, por todo o seu amorzinho e amizade incondicional, por sua personalidade forte e inspiradora (recheada de fofurices eternas). O melhor presente que eu poderia ganhar nessa vida. 'Te amor'!

Ao Filipe, meu amor, companheiro e amigo que me incentiva a querer ser sempre mais do que eu posso sonhar, pelas palavras e gestos de carinho que me deram suporte nesses últimos anos e a quem devo grande parte da força de vontade para concluir essa etapa de minha vida. Te amo! Agradeço também a toda sua querida família pelo carinho e preocupação comigo, por me tratarem como se eu fosse uma Giacomelli.

Aos meus amigos da elétrica e as agregadas Aninha e Fãr, pelas jantinhas, risadas e descarrego de estresse nos momentos de angústia, por estarem comigo desde o começo da minha jornada acadêmica e por persistirem em me aguentar mesmo depois de me conhecerem tão bem. Amo vocês!

À Professora Ana Lucia, pela orientação e dedicação, que me acolheu e foi um grande exemplo de professora, orientadora e de pessoa, que me fez admirar ainda mais a profissão de professor e que me incentiva a querer fazer a diferença na vida de outras pessoas da mesma forma como ela fez a diferença na minha.

Ao Professor Nelson, que me aceitou de braços abertos, pela disponibilidade e pelas sugestões para a conclusão deste trabalho;

Aos demais professores, pelos ensinamentos profissionais e de conduta, essenciais para a minha formação;

Aos queridos que participaram diretamente nesse trabalho: Francis, por estar sempre ao meu lado no caminho da pesquisa, aprendendo, errando, acertando, discutindo, brigando, rindo, tramando, descabelando, como todo bom irmão faz. Maurício, pelos

ensinamentos profissionais, pelo carinho e pelo apoio durante todo o meu tempo de laboratório, sempre disposto a ensinar e ajudar. Julia, por ser uma grande amiga dentro e fora da universidade, pela companhia nas longas horas de contagem de campo aberto e bombomzinhos do RU. Agradeço infinitamente as lindas Dai e Camis, pela amizade gostosa e pela paciência (muita!) em me ajudar e ensinar técnicas from Hell de dosagens bioquímicas essenciais para este trabalho. Muito obrigada!

Aos queridos do laboratório que tiveram um papel essencial de apoio emocional nesse trabalho:

Ao Louie e a Vivs, pelos desabaços mútuos, pelas conversas sobre a vida e sobre teorias científicas malucas (ou não), pelo carinho que me fizeram me sentir em casa e desejar poder coloca-los em um potinho e levar comigo para onde eu for para o resto da vida! Pra vocês faria mil sucos de abacaxi :). Lu, por permitir que eu dividisse meus anseios e conquistas em almocinhos saudáveis e conversas gostosas. Pri, com sua doçura e amizade pra qualquer hora, sempre disposta a ajudar a quem precisar, que me ensinou a fazer as figuras que enriquecem este trabalho. Morgs, por tantas fofuras disfarçadas por trás da moça concentrada, por me acudir nos Blottings estranhos e por seu exemplo de caráter. Collinha, com suas indagações e opiniões marcantes, por sem saber me incentivar a pensar fora da caixinha e pela amizade. Giords, Andi, Pati, Manu e Vicente que, cada um de uma maneira especial e única, deixou sua marquinha para sempre no coração.

Aos queridos Karen, Wagner, Chris e Gianni, por me acolherem na mesa 33 com muitas risadas, cerveja gelada e acima de tudo, pela amizade intensa e inesquecível dos últimos meses.

A Deus, por me ouvir, me guiar e acalmar meu coração.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E aos bichinhos, minha gratidão infinita e meu eterno reconhecimento.

RESUMO

Os tratamentos farmacológicos disponíveis para a depressão demandam semanas para surtir efeito e podem causar efeitos adversos aos pacientes. Assim, há uma constante necessidade de desenvolver terapias alternativas de ação mais rápida, segura e efetiva. O exercício físico apresenta efeitos benéficos sobre diversas doenças e distúrbios neurológicos como Parkinson, Alzheimer, depressão e declínio de funções cognitivas. A creatina, um composto endógeno ou obtido pela ingestão de alguns alimentos possui propriedade antidepressiva. Nosso grupo demonstrou que a administração aguda de creatina em camundongos apresentou efeito tipo-antidepressivo num teste preditivo (Teste do Nado Forçado, TNF). O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito tipo-antidepressivo da terapia combinada de creatina com exercício físico e avaliar a expressão de neurotrofinas no hipocampo de camundongos. Para alcançar este objetivo, foram desenvolvidas as seguintes etapas: i) investigar o efeito tipo-antidepressivo do tratamento crônico por 14 dias com creatina ou fluoxetina; ii) analisar amostras do hipocampo destes animais para verificar seus efeitos sobre a expressão de neurotrofinas (BDNF, VEGF e FGF-2); iii) verificar o efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao exercício físico prolongado (14, 21 e 28 dias); iv) investigar o efeito tipo-antidepressivo do tratamento crônico (14 dias) da terapia combinada de creatina ou fluoxetina junto com exercício físico (14 dias); v) analisar amostras do hipocampo dos animais tratados com a terapia combinada de antidepressivos e exercício físico para determinar a expressão das neurotrofinas. O tratamento (por via oral) de camundongos durante 14 dias com fluoxetina (1 e 10 mg/kg) ou creatina (0,1 e 1 mg/kg) apresentou efeito tipo-antidepressivo no TNF. Fluoxetina na dose de 10 mg/kg ou creatina na dose de 1 mg/kg administradas por 14 dias aumentaram o imunocontéudo de BDNF, mas não alteraram o de VEGF e FGF-2. A expressão gênica de BDNF (RNAm, determinada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, qRT-PCR) foi aumentada somente pela fluoxetina. O tratamento com fluoxetina ou creatina não alterou significativamente a expressão gênica de VEGF e de FGF-2. Para avaliar os efeitos do exercício físico, os animais foram submetidos por 14, 21 e 28 dias a uma esteira durante 40 minutos/dia, em velocidades de 6, 8, 10 e 12 metros/minuto, na primeira, segunda, terceira e quarta semana, respectivamente. Os animais exercitados durante 21 e 28 dias apresentaram um efeito tipo-antidepressivo no TNF. Na última etapa, os camundongos foram submetidos à terapia combinada de fluoxetina ou creatina associada ao exercício físico durante 14 dias, em doses e tempos que não mostraram efeito tipo-antidepressivo. A terapia combinada de exercício físico com doses subativas de fluoxetina (0,1 mg/kg) ou creatina (0,01 mg/kg) produziram um efeito sinérgico comportamental no TNF. Assim, estes dados sugerem que o tratamento com doses menores de fluoxetina com exercício físico pode ser uma terapia alternativa no tratamento da depressão. Adicionalmente, a terapia combinada de exercício e creatina aumentou a

expressão protéica e gênica de BDNF no hipocampo. Os resultados indicam que a creatina associada ao exercício físico poderia atuar aumentando a transcrição, tradução e clivagem de BDNF. Em conclusão, estes dados mostram que a creatina aumenta a expressão de BDNF e que as terapias combinadas poderiam ser alternativas potenciais para o tratamento da depressão.

Palavras-chave: creatina, exercício físico, fluoxetina, depressão, BDNF.

ABSTRACT

Pharmacological treatments available for depression require weeks to produce effect and may cause adverse effects. Thus, there is a constant need to develop alternative therapies more fast, safe and effective. The exercise has beneficial effects on many diseases and neurological disorders such as Parkinson's, Alzheimer's, depression and decline of cognitive functions. Creatine, an endogenous compound or obtained by the ingestion of certain foods has antidepressant property. Our group demonstrated that acute administration of creatine in mice showed antidepressant-like effect in predictive test (Forced Swimming Test, FST). The aim of this study was to investigate the antidepressant-like effect of combined therapy of physical exercise with creatine and evaluate the expression of neurotrophins in the mice hippocampus. To accomplish this, the following steps were taken: i) investigate the antidepressant-like effect of chronic treatment for 14 days with creatine or fluoxetine; ii) analyze samples from the hippocampus of these animals for their effects on the expression of neurotrophins (BDNF, VEGF and FGF-2); iii) investigate the antidepressant-like effect in mice subjected to prolonged physical exercise (14, 21 and 28 days); iv) to investigate the antidepressant-like effect of chronic treatment (14 days) of combined therapy of physical exercise with creatine or fluoxetine (14 days); v) analyzing samples of the hippocampus of animals treated with the combined therapy of antidepressants and exercise to determine the expression of neurotrophins. The treatment (per oral) of mice for 14 days with fluoxetine (1 and 10 mg/kg) or creatine (0.1 and 1 mg/kg) showed antidepressant-like effect in the FST. Fluoxetine (10 mg/kg) or creatine (1 mg/kg) administered for 14 days increased the immunoccontent BDNF but did not alter the VEGF and FGF-2. The gene expression of BDNF (mRNA, determined by Real-Time Polymerase Chain Reaction qRT-PCR) was increased only by fluoxetine. Treatment with fluoxetine or creatine did not significantly alter the gene expression of VEGF and FGF-2. To assess the effects of physical exercise, the animals were subjected to 14, 21 and 28 days at a treadmill for 40 minutes/day at speeds of 6, 8, 10 and 12 meters/minute in the first, second, third and fourth week, respectively. The animals exercised for 21 and 28 days showed an antidepressant-like effect in the FST. In the last step, the mice were subjected to combined therapy of fluoxetine or creatine associated with physical exercise for 14 days at doses and times that did not show antidepressant-like effect. The combination of

physical exercise with subeffective doses of fluoxetine (0.1 mg/kg) or creatine (0.01 mg/kg) produced synergistic behavioral effects in the FST. Thus, these data suggest that treatment with fluoxetine at lower doses with physical exercise may be an alternative therapy in the treatment of depression. Additionally, the combined therapy of exercise and creatine increased the protein and gene expression of BDNF in the hippocampus. The results indicate that creatine associated with physical exercise could act by increasing transcription, translation and cleavage of BDNF. In conclusion, these data show that creatine increases the expression of BDNF and that combined therapies could be potential alternatives for the treatment of depression.

Keywords: creatine, exercise, fluoxetine, depression, BDNF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismos pelos quais os antidepressivos modulam as monoaminas e neurotrofinas em pacientes com depressão	25
Figura 2 Síntese de creatina e o sistema creatina/fosfocreatina	30
Figura 3. A creatina no Sistema Nervoso Central	32
Figura 4. Teste do nado forçado.....	34
Figura 5. Teste do campo aberto.....	35
Figura 6. Efeito do tratamento com creatina por 14 dias nas doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg (p.o.) no TNF e no TCA.....	42
Figura 7. Efeito do tratamento com fluoxetina por 14 dias nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (p.o.) no TNF e no TCA.....	43
Figura 8. Efeito do tratamento com fluoxetina (10mg/kg) ou creatina (1mg/kg) por 14 dias (p.o.) no TNF e no TCA.....	44
Figura 9. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) no imunoconteúdo de BDNF no hipocampo de camundongos.....	45
Figura 10. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) no imunoconteúdo de VEGF no hipocampo de camundongos.....	46
Figura 11. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) no imunoconteúdo de FGF-2 no hipocampo de camundongos.....	47
Figura 12. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de BDNF no hipocampo de camundongos.....	48
Figura 13. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de VEGF no hipocampo de camundongos.....	49
Figura 14. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de FGF-2 no hipocampo de camundongos.....	50

Figura 15. Efeito do exercício físico na esteira por 14, 21 ou 28 dias no TNF (A), e no TCA (B).....	52
Figura 16. Efeito do exercício físico na esteira em combinação com creatina ou fluoxetina no TNF (A), e no TCA (B).....	53
Figura 17. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina, com creatina ou veículo (p.o.) no imunocontéudo de BDNF no hipocampo de camundongos.....	54
Figura 18. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina, com creatina ou veículo (p.o.) no imunocontéudo de VEGF no hipocampo de camundongos.....	55
Figura 19. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina, com creatina ou veículo (p.o.) no imunocontéudo de FGF-2 no hipocampo de camundongos.....	56
Figura 20. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina, com creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de BDNF no hipocampo de camundongos.....	57
Figura 21. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina, com creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de VEGF no hipocampo de camundongos.....	58
Figura 22. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina, com creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de FGF-2 no hipocampo de camundongos.....	59
Figura 23. Possível mecanismo de ação da terapia combinada de creatina e exercício físico sobre a modulação de BDNF.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sintomas da Depressão.....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT1a – receptor específico 1A de serotonina
ACTB- actina B
ADP - adenosina 5' - difosfato
Akt ou PKB - proteína cinase B
AMP - adenosina 5' - monofosfato
AMPc - adenosina 5' - monofosfato cíclico
ANOVA - análise de variância
ATP - adenosina 5' - trifosfato
BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo
CaMKII - cálcio calmodulina cinase II
CC - creatina cinase
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CPN - células progenitoras neurais
Cr - creatina
CREB - elemento de ligação de resposta ao AMP cíclico
CRT - transportador de creatina
E.P.M. - erro padrão da média
ERK - proteína cinase regulada por sinal extracelular
FGF-2 - fator de crescimento de fibroblastos básico
Flk-1- cinase de fígado fetal 1 (receptor de VEGF)
Flt-1- tirosina cinase 1 semelhante a fms (receptor de VEGF)
GAA - ácido guanidino acetato
GABA - ácido gama aminobutírico
GAMT - glicina-m-metiltransferase
GMPc - guanosina 5'-monofosfato cíclico
GSK3-β - glicogênio sintase cinase 3-β
HPA - hipotálamo-hipófise-adrenal
ISRN- inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina
ISRS - inibidor seletivo da recaptação de serotonina
IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
MAO - monoamino oxidase
MAPK - proteína cinase ativada por mitógeno
mTOR - proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NGF - fator de crescimento do nervo
NMDA - N-metil-D-aspartato
ON - óxido nítrico
ONS - óxido nítrico sintase
PCr - fosfocreatina

PI3K - fosfatidilinositol 3'-cinase
PKA - proteína cinase dependente de AMP cíclico
PKC - proteína cinase C
p.o. - per os (via oral)
qRT-PCR - "real-time" PCR quantitativo
RNAm - ácido ribonucleico mensageiro
SAM - S-adenosil-metionina
SNC - sistema nervoso central
TCA - teste do campo aberto
TNF - teste do nado forçado
tPA - ativador de plasminogênio tecidual
TrkB - tropomiosina cinase B (receptor de BDNF)
TSC - teste de suspensão pela cauda
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
VGF - fator de crescimento do nervo induzível

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1	Depressão	21
1.1.1	Diagnóstico	21
1.1.2	Hipótese Monoaminérgica e tratamento da Depressão.....	22
1.1.3	Hipótese Neurotrófica da Depressão.....	24
1.2	Exercício Físico	28
1.2.1	Exercício Físico e o Sistema Nervoso Central	28
1.3	Creatina	29
1.3.1	Creatina no Sistema Nervoso Central	31
1.4	Testes Comportamentais	34
1.4.2	Teste do Nado Forçado	34
1.4.3	Teste do Campo Aberto	35
2.	JUSTIFICATIVA	36
3.	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Drogas e Compostos utilizados	38
4.2	Animais	38
4.2.1	Tratamento com creatina ou fluoxetina	38
4.2.2	Exercício físico	38
4.2.3	Terapia combinada de exercício físico com creatina ou fluoxetina	39
4.3	Testes comportamentais	39

4.3.1	Teste do Nado Forçado (TNF)	39
4.3.2	Teste do Campo Aberto (TCA)	39
4.4	Análise da expressão de neurotrofinas.....	40
4.4.1	Imunodeteção de proteínas.....	40
4.4.2	Avaliação da expressão gênica (RNAm).....	40
4.5	Análise estatística	41
5.	RESULTADOS	42
5.1	Estudo do efeito tipo-antidepressivo da administração crônica de creatina e fluoxetina	42
5.1.1	Curva dose-resposta do tratamento com creatina por 14 dias..	42
5.1.2	Curvas dose-resposta do tratamento com fluoxetina por 14 dias.....	43
5.1.3	Comparação entre o tratamento crônico com creatina ou com fluoxetina	44
5.2	Efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou creatina sobre o imunoconteúdo de neurotrofinas no hipocampo.....	45
5.2.1	BDNF	45
5.2.2	VEGF	46
5.2.3	FGF-2	47
5.3	Efeito do tratamento com fluoxetina ou creatina sobre a expressão gênica de neurotrofinas no hipocampo.....	48
5.3.1	BDNF	48
5.3.2	VEGF	49
5.3.3	FGF-2	50
5.4	Estudo da terapia combinada de exercício físico com creatina ou fluoxetina: efeito tipo-antidepressivo e expressão de neurotrofinas.....	51
5.4.1	Curva tempo-resposta do efeito tipo-antidepressivo do exercício físico na esteira	51
5.4.2	Efeito tipo-antidepressivo sinérgico da terapia combinada de exercício físico com fluoxetina ou com creatina	52

5.5	Efeito do tratamento combinado de exercício físico e fluoxetina ou creatina sobre o imunocontéudo de neurotrofinas no hipocampo	54
5.5.1	BDNF	54
5.5.2	VEGF	55
5.5.3	FGF-2	56
5.6	Efeito do tratamento combinado de exercício físico e fluoxetina ou creatina sobre a expressão gênica de neurotrofinas no hipocampo.....	57
5.6.1	BDNF	57
5.6.2	VEGF	58
5.6.3	FGF-2	59
6.	DISCUSSÃO	60
7.	CONCLUSÕES	70
8.	PERSPECTIVAS	71
9.	REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é um transtorno de humor crônico e recorrente de alta prevalência, que acomete cerca de 7 a 15% dos homens e 10 a 30% das mulheres (NAIR e VAIDYA, 2006; TIERNEY, 2007). Estima-se que aproximadamente 17% da população mundial apresentará pelo menos um episódio de depressão ao longo da vida (PINCUS e PETTIT, 2001; KESSLER *et al.*, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), esse transtorno afeta cerca de 121 milhões de pessoas e atualmente é considerada a quarta maior causa de incapacitação e de mortalidade no mundo, uma vez que o indivíduo apresenta dificuldades de interações sociais e diminuição da qualidade de vida. Algumas projeções também mostram que a depressão possivelmente será a segunda maior causa de incapacitação em adultos até o ano de 2020 (MURRAY e LOPEZ, 1997; SKOLNICK, POPIK e TRULLAS, 2009). Além disso, diversos estudos reforçam o impacto que a depressão exerce sobre a população, uma vez que este transtorno apresenta comorbidade com outras doenças, como Alzheimer, Parkinson, doenças cardiovasculares e câncer, e além do fato de que cerca de 15% dos indivíduos com depressão maior cometem suicídio (MUSSELMAN, EVANS e NEMEROFF, 1998; NESTLER *et al.*, 2002b; CHEN, J. J. e MARSH, 2013; YOUNG, 2013).

Apesar de ser uma doença de grande impacto social e econômico, pouco se sabe sobre a etiologia da depressão (BLAZER, 2000). Vários fatores de risco estão envolvidos no desenvolvimento da doença, sendo o fator hereditário com influencia entre 40-50% sobre esse risco, além de fatores ambientais como estresse emocional, doença física e traumas de infância (BERTON e NESTLER, 2006).

1.1.1 Diagnóstico

O diagnóstico da depressão é feito pela análise da manifestação de um conjunto de sintomas, uma vez que ainda não foram descritos marcadores bioquímicos específicos para a doença. Segundo a American Psychiatric Association (2000), para ser diagnosticado com este transtorno o indivíduo deve apresentar pelo menos 5 de 9 sintomas (Tabela 1), incluindo obrigatoriamente humor deprimido e/ou anedonia por pelo menos duas semanas:

Tabela 1. Sintomas da Depressão

Humor deprimido durante a maior parte do dia

Falta de interesse ou prazer em realizar todas ou a maior parte das atividades

Perda ou ganho significativo de peso

Insônia ou excesso de sono

Agitação ou retardo psicomotor

Fadiga ou perda de energia

Sentimento de desvalia ou culpa

Dificuldade de concentração ou diminuição na habilidade de pensar

Pensamentos recorrentes de morte e suicídio

Nesse contexto, a doença apresenta dificuldades de diagnóstico por poder ser confundida com outros transtornos psiquiátricos, como o transtorno bipolar ou com o abuso de drogas e uso de medicamentos.

1.1.2 Hipótese monoaminérgica e tratamento da depressão

Ao longo das últimas décadas, vários estudos mostraram a importância do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão (SCHILDKRAUT, 1974). Esses estudos mostraram que baixos níveis de monoaminas (serotonina, noradrenalina e/ou dopamina) na fenda sináptica, bem como a quantidade e sensibilidade de seus receptores, desencadeiam uma deficiência na neurotransmissão que culmina no desenvolvimento da depressão (MANN *et al.*, 1996; DELGADO, 2000; WONG e LICINIO, 2001). O déficit no sistema monoaminérgico como uma das possíveis causas da depressão é chamado de **hipótese monoaminérgica**.

Deste modo, os tratamentos para a depressão envolvem o aumento da biodisponibilidade de monoaminas, principalmente serotonina e noradrenalina, na fenda sináptica. Dentre as diferentes classes de antidepressivos utilizadas na terapêutica podem ser citadas: i) os inibidores da enzima monoamina oxidase retardam a degradação de monoaminas na fenda sináptica. Estes compostos são considerados os menos seletivos, pois apresentam uma maior quantidade de efeitos

adversos; ii) os antidepressivos tricíclicos inibem a recaptação de monoaminas pelos neurônios pré-sinápticos, aumentando a sua disponibilidade na fenda sináptica e ativação dos receptores presentes nos neurônios pós-sinápticos (NESTLER *et al.*, 2002a; HAMON e BLIER, 2013); iii) os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS; por exemplo a fluoxetina®) e noradrenalina bloqueiam os receptores e transportadores pré-sinápticos dessas monoaminas, aumentando a presença dos neurotransmissores na fenda sináptica (NEMEROFF e OWENS, 2002). Apesar de atuarem de maneira mais seletiva, ensaios clínicos mostram que cerca de 27% dos pacientes apresentam efeitos adversos durante o uso dessa classe de antidepressivos, sendo os efeitos mais prevalentes náusea, anorexia, diarreia, insônia, agitação, ansiedade e nervosismo (TRINDADE *et al.*, 1998). Os efeitos adversos parecem estar diretamente relacionados com a dose utilizada e contribuem para a descontinuidade do tratamento em cerca de 15% dos pacientes (BEASLY, 1991; MONTGOMERY *et al.*, 1994).

Além dos efeitos adversos, os antidepressivos disponíveis no mercado apresentam um efeito terapêutico “tardio”, isto é, os efeitos sobre os sintomas somente são observados após semanas ou até mesmo meses de tratamento (TRIVEDI *et al.*, 2006). Mais importante, somente cerca de 50% dos pacientes alcançam uma remissão completa dos sintomas (NESTLER *et al.*, 2002b).

Os efeitos farmacológicos dos compostos antidepressivos envolvem a participação de diferentes tipos de receptores. Um dos receptores que medeiam o efeito dos ISRS são os receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT_{1a} (HENSLER, 2002; MIDDLEMISS, PRICE e WATSON, 2002). Esses receptores estão localizados nos neurônios pré- e pós-sinápticos e exercem diferentes efeitos sobre a biodisponibilidade de serotonina. A ativação pós-sináptica dos receptores 5-HT_{1a} está aumentada em ratos tratados com ISRS, (BANTICK, DE VRIES e GRASBY, 2005; DIAZ-MATAIX *et al.*, 2005). Por outro lado, a ativação de receptores 5-HT_{1a} pré-sinápticos bloqueia a liberação de serotonina na fenda sináptica, levando a um efeito oposto ao desejado no tratamento da depressão (BANTICK, DE VRIES e GRASBY, 2005; DIAZ-MATAIX *et al.*, 2005).

Os receptores α -adrenérgicos modulam a liberação de dopamina e noradrenalina e são também potenciais alvos no desenvolvimento de novas terapias antidepressivas. De fato, alguns antidepressivos atuam aumentando a densidade desses receptores no hipocampo e córtex cerebral de camundongos e ratos (REHAVI *et al.*,

1980; RUMP e MAJEWSKI, 1987; HOLSBOER e BARDEN, 1996; DEUPREE, REED e BYLUND, 2007; VERHEIJ e COOLS, 2009).

1.1.3 Hipótese neurotrófica da depressão

Além da deficiência de monoaminas, outros fatores estão envolvidos como causas da depressão. Isto porque os antidepressivos aumentam rapidamente a biodisponibilidade de monoaminas, entretanto a remissão dos sintomas ocorre somente após longos períodos de tratamento. Além disso, depletar as monoaminas em pacientes saudáveis não produz as alterações de humor (RUHE, MASON e SCHENE, 2007).

Dessa forma, autores sugerem que o efeito terapêutico se deve a adaptações *downstream* das vias de sinalização ativadas pelas monoaminas, como regulação de genes que modulam processos fisiológicos como neuroplasticidade, neurogênese e neuroproteção (DUMAN, R. S., HENINGER e NESTLER, 1997).

Estudos mostram que pacientes deprimidos apresentam um volume hipocampal reduzido e que, em modelos animais, o tratamento com antidepressivos previne essa alteração (DUMAN, R. S., 2004; VIDEBECH e RAVNKILDE, 2004; DRANOVSKY e HEN, 2006). Adicionalmente, estudos evidenciam que esse tratamento leva a um aumento da ativação de vias de sinalização intracelular que culminam na fosforilação e ativação do elemento de ligação de resposta ao AMPc (CREB), responsável pela sinalização da síntese de diversos fatores neurotróficos envolvidos na sobrevivência neuronal (NESTLER *et al.*, 2002a). De acordo com vários trabalhos, a deficiência de fatores neurotróficos, também chamada de ***hipótese neurotrófica***, tem papel fundamental para o desenvolvimento da depressão. A reversão dessa deficiência por antidepressivos possivelmente exerce uma função essencial na remissão dos sintomas (NESTLER *et al.*, 2002a; DUMAN, R. S. e MONTEGGIA, 2006).

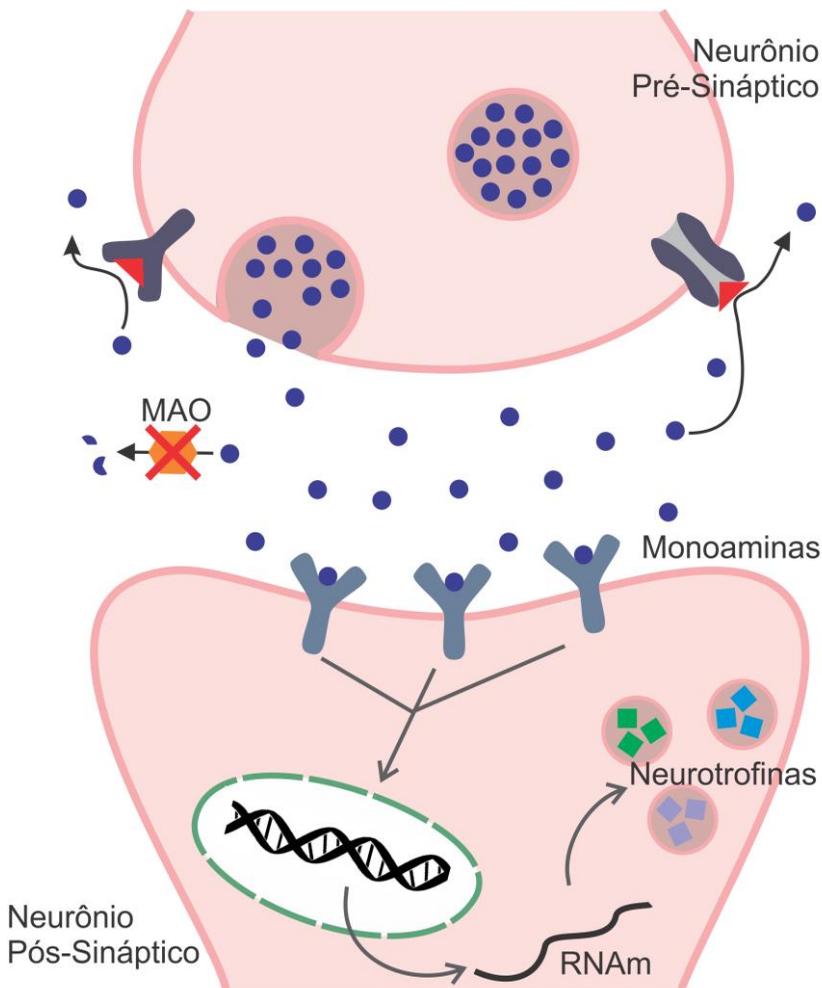


Figura 1. Mecanismos de ação dos antidepressivos na modulação das monoaminas e na expressão de neurotrofinas. Os antidepressivos (em vermelho) atuam inibindo a recaptação e a degradação de monoaminas, levando a um aumento de sua biodisponibilidade na fenda sináptica. A interação das monoaminas com os receptores pós-sinápticos ativam cascatas de sinalização que no núcleo induzem a transcrição (expressão gênica - formação de RNAmensageiro). O RNAm é utilizado no citoplasma para a tradução (síntese de proteínas – como as neurotrofinas), que quando liberadas desencadeiam processos pró-neurogênicos, de proliferação e de sobrevivência celular.

Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram que a depressão está associada à diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo e que antidepressivos revertem esse efeito (NIBUYA, MORINOBU e DUMAN, 1995; CHEN, B. *et al.*, 2001; DUMAN, R. S. e MONTEGGIA, 2006; BALU *et al.*, 2008). Além disso, o aumento nos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) reverte a atrofia observada no córtex cerebral e hipocampo de pacientes com depressão (CASTREN, 2004). Diversas evidências demonstram que o tratamento da depressão leva a um aumento na sinalização intracelular via AMPc e ativação de cascatas que culminam na fosforilação do CREB. Este fator por sua vez, ativa a síntese de BDNF e de outras neurotrofinas (NESTLER *et al.*, 2002a). O BDNF é sintetizado no retículo endoplasmático como pró-BDNF, é transportado por vesículas a axônios e dendritos e liberado no espaço extracelular, onde sofre clivagem a BDNF maduro. Sua interação com seu receptor tipo tirosinacina (TrkB) ativa as vias da PKC, da Akt e da ERK e induz, dentre outros eventos, a neurogênese e a sobrevivência celular (LU, PANG e WOO, 2005).

Além do BDNF, outros fatores neurotróficos estão sendo associados à fisiopatologia da depressão, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento do fibroblasto 2 (FGF-2), o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (SHI *et al.*, 2010; JAROSIK *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2011; FOURNIER e DUMAN, 2012). A modulação de diferentes vias de sinalização intracelular estão associadas a esse aumento de fatores neurotróficos que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular, como a ativação da via que envolve a enzima cálcio calmodulina cinase II (CaMKII), a ativação das vias da proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA), da via da proteína cinase B (PKB ou Akt), da proteína cinase C (PKC) e a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) e cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (DWIVEDI *et al.*, 2001; MANJI, DREVETS e CHARNEY, 2001; PERERA *et al.*, 2007; PITTENGER e DUMAN, 2008; SZEGEDI *et al.*, 2011; GUO e FENG, 2012; ZHONG *et al.*, 2012).

O fator de crescimento VEGF atua como mitógeno de células endoteliais e está implicado na vascularização e angiogênese. Um estudo pioneiro mostrou que células em divisão na zona subgranular do hipocampo formam aglomerados ligados à vasculatura e que 37% dessas células apresentam marcadores de células endoteliais; após algumas

semanas essas células recém nascidas desapareceram (PALMER, WILLHOITE e GAGE, 2000). Estes autores então sugeriram que a neurogênese está associada a um processo de recrutamento de células endoteliais e subsequente diferenciação (PALMER, WILLHOITE e GAGE, 2000). Um dado importante é que a ativação do receptor de VEGF, chamado de Flk-1, é essencial para a neurogênese hipocampal em ratos (JIN, K. *et al.*, 2002).

A isoforma predominante VEGF₁₆₄ em camundongos, seu análogo VEGF₁₆₅ em humanos, e seus receptores VEGF1 (Flt-1) e VEGF2 (Flk-1) estão presentes em neurônios e astrócitos (ROSENSTEIN e KRUM, 2004). A ativação desses receptores induz a neurogênese e o brotamento de neuritos, aperfeiçoa a regeneração dos neurônios, protege contra hipóxia e toxicidade glutamatérgica e está envolvido nos processos de aprendizagem e memória no hipocampo (SILVERMAN *et al.*, 1999; SONDELL, LUNDBORG e KANJE, 1999; JIN, K. L., MAO e GREENBERG, 2000; SCHRATZBERGER *et al.*, 2000; SONDELL, SUNDLER e KANJE, 2000; FABEL *et al.*, 2003; CAO *et al.*, 2004). Estudos recentes reportam as vias de sinalização envolvidas nesses efeitos do VEGF, como a ativação da via da CAMKII/ERK e da via da PI3K/mTOR (KIM *et al.*, 2008). Estudos em animais sugerem que a diminuição do fluxo de sangue no hipocampo antecede o desenvolvimento da depressão, e que o efeito antidepressivo observado com VEGF está intimamente relacionado com a estimulação da neurogênese e angiogênese nessa região (HEINE *et al.*, 2005; WARNER-SCHMIDT e DUMAN, 2007).

Outro fator neurotrófico que pode estar envolvido na fisiopatologia da depressão é o FGF-2, uma vez que existe uma diminuição desse fator de crescimento e de seus receptores no hipocampo e outras estruturas cerebrais de pacientes com depressão. Além disso, essas alterações são revertidas pela administração de antidepressivos, que levam a um aumento nos níveis de FGF-2 após o tratamento dos animais com esses fármacos (MALLEI, SHI e MOCCHETTI, 2002; EVANS *et al.*, 2004; GAUGHRAN *et al.*, 2006). Altos níveis de FGF-2 são encontrados principalmente em nichos de células progenitoras neurais (CPN) na zona subventricular e na zona subgranular do giro dentado do hipocampo, regulando a proliferação e diferenciação dessas células em neurônios e células da glia (TAO, BLACK e DICICCO-BLOOM, 1996; RAI, HATTIANGADY e SHETTY, 2007). No entanto, o FGF-2 possui uma influência maior no destino, migração e diferenciação das CPNs do que em sua proliferação, uma vez que camundongos knockout para FGF-2 não apresentam

diminuição na proliferação de CPN, mas estas encontram dificuldade em migrar para as camadas do córtex (DONO *et al.*, 1998; WERNER, UNSICKER e VON BOHLEN UND HALBACH, 2011).

1.2 Exercício Físico

Os benefícios do exercício físico (forçado) e da atividade física (voluntária) para a saúde da população, inclusive para a saúde mental são inúmeros e frequentemente enfatizados. Além disso, o exercício físico apresenta efeito neuroprotetor sobre diversas doenças e distúrbios neurológicos incluindo Parkinson, Alzheimer, depressão e declínio de funções cognitivas relacionadas com a idade (DISHMAN *et al.*, 2006).

1.2.1 Exercício Físico e o Sistema Nervoso Central

Animais submetidos a diferentes protocolos experimentais mostram que o exercício físico (forçado), bem como a atividade física (voluntária), promovem um aumento na expressão de BDNF (BERCHTOLD *et al.*, 2001; VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2003; ADLARD *et al.*, 2004; CHEN, M. J. e RUSSO-NEUSTADT, 2005; CHEN, M. J., IVY e RUSSO-NEUSTADT, 2006; HUNSBERGER *et al.*, 2007; VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2007; DUMAN, C. H. *et al.*, 2008; CASSILHAS *et al.*, 2012). Estes efeitos foram relacionados com a ativação da via da fosfatidilinositol-3 cinase (CHEN, M. J. e RUSSO-NEUSTADT, 2005) e da CaMK-II (VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2007). Além disso, um estudo recente com animais demonstrou que o efeito antidepressivo induzido pelo exercício físico é dependente da interação entre VEGF e seu receptor Flk-1 (KIUCHI, LEE e MIKAMI, 2012). Outros fatores de crescimento também têm seus níveis ou expressão gênica aumentados pelo exercício físico, como o NGF (NEEPER *et al.*, 1996; ANG *et al.*, 2003; CHAE *et al.*, 2012), IGF-I (DING *et al.*, 2006; CHEN, M. J. e RUSSO-NEUSTADT, 2007), FGF-2 (GOMEZ-PINILLA, DAO e SO, 1997) e fator de crescimento do nervo induzível (NGF) (HUNSBERGER *et al.*, 2007).

Diversos estudos mostram o efeito antidepressivo do exercício físico. Camundongos submetidos ao exercício físico e tratados com fluoxetina possuem uma expressão maior de BDNF no hipocampo do que os animais submetidos somente ao exercício físico (ENGESSER-

CESAR, ANDERSON e COTMAN, 2007). Outro grupo demonstrou que o tratamento de animais com os antidepressivos tranilcipromina ou imipramina em combinação com o exercício físico possui efeito aditivo na expressão gênica de BDNF hipocampal (RUSSO-NEUSTADT, A., BEARD e COTMAN, 1999; RUSSO-NEUSTADT, A. A. *et al.*, 2000; RUSSO-NEUSTADT, A. *et al.*, 2001) A combinação de exercício físico com a administração de creatina reduziu as crises epilépticas em modelos animais de epilepsia (RAMBO *et al.*, 2009).

1.3 Creatina

A creatina (*N-aminoiminometil-N-metilglicina*) é um composto tipo-guanidina sintetizado nos rins, fígado, pâncreas e, em menor quantidade, no encéfalo. A primeira etapa de síntese (ver Figura 2) ocorre nos rins, onde os aminoácidos glicina e arginina sofrem uma reação catalisada pela enzima glicinaamidinotransferase (AGAT) que resulta em uma molécula de ornitina e uma de ácido guanidino acetato (GAA). Esse ácido é transportado para o fígado ou pâncreas onde ocorre a segunda etapa da síntese, catalisada pela enzima glicina-M-metiltransferase (GAMT), onde um grupo metil da metionina do composto S-adenosilmetionina é transferido para o ácido guanidino acetato, formando a creatina (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000; BEARD e BRAISSANT, 2010). Outra fonte de obtenção de creatina é a partir da dieta em fontes como leite, carnes e peixes, e é absorvida pelo intestino (WALKER, 1979; ANDRES *et al.*, 2008).

O foco da maioria dos estudos envolvendo a creatina está na capacidade deste composto de aprimorar condições fisiológicas do indivíduo com o intuito de melhorar o desempenho quando submetido ao exercício físico. Resultados demonstram os efeitos ergogênicos benéficos e consistentes da creatina em atividades esportivas envolvendo repetição e curtos acessos de aumento de intensidade (WILLIAMS e BRANCH, 1998; BENZI, 2000; BEMBEN e LAMONT, 2005).

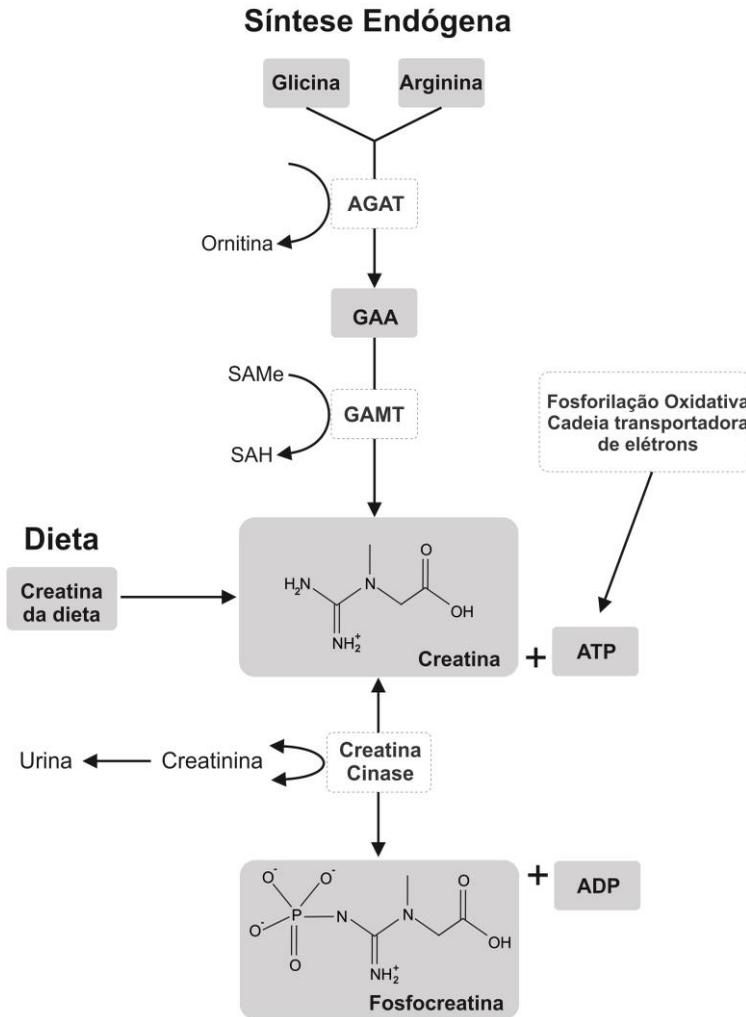


Figura 2. Síntese de Creatina e o sistema Creatina/Fosfocreatina. A Glicina e Arginina sofrem uma reação catalisada pela enzima glicinaamidotransferase (AGAT) que resultam em uma Ornitina e um ácido guanidino acetato (GAA). Catalisada pela enzima glicina-M-metiltransferase (GAMT), um grupo metil do composto S-adenosilmetionina (S-AdoMet) é transferido para o ácido guanidinoacetato (GAA), formando a Creatina. A Creatina sofre interconversão a Fosfocreatina pela enzima Creatina Cinase, liberando creatinina como metabólito que é excretado pela urina. SAH: S-adenosilhomocisteína.

Independente de sua origem, a creatina é transferida por difusão aos vasos sanguíneos, que por sua vez a transferem para os tecidos que possuem transportadores específicos dependentes de sódio e cloreto (CRT) (ver Figura 3). Estes transportadores são encontrados nos rins, coração, músculo liso, fígado, encéfalo e na barreira hematoencefálica (SNOW e MURPHY, 2001). Nos tecidos, a creatina desempenha um papel importante no metabolismo energético pela interconversão em seu análogo fosforilado de alto poder energético, a fosfocreatina (PCr). Essa reação, catalisada pela enzima creatina cinase mitocondrial no sentido de formação de PCr e ADP e pela enzima Creatina cinase (CC) citosólica para formação de creatina e ATP, acontece em tecidos que possuem demanda energética flutuante, como encéfalo e músculos. O processo de fosforilação e defosforilação produz creatinina como metabólito, que é transportada e excretada pelos rins (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000; BEARD e BRAISSANT, 2010).

1.3.1 Creatina no Sistema Nervoso Central

Evidências mostram uma possível síntese de creatina no encéfalo, uma vez que as enzimas responsáveis por esta síntese - AGAT e GAMT - estão expressas em neurônios, oligodendrócitos e astrócitos. Entretanto, apenas 12% dessas células expressam as duas enzimas enquanto 30% delas expressam somente uma, possivelmente porque cada célula participa da síntese de creatina em etapas diferentes (BRAISSANT e HENRY, 2008).

Como ilustrado nas Figuras 2 e 3, depois de sintetizada, a creatina pode ser interconvertida em PCr, atuando no transporte do grupo fosfato produzido na mitocôndria para seus locais de consumo dentro da célula, prevenindo oscilações bruscas nos níveis de ATP e ADP que poderiam ocorrer nesses sítios. Assim, funções cerebrais que requerem energia, como transporte de sódio e cálcio, sinalização intracelular e transporte axonal e dendrítico, acionam o sistema Cr/PCr (AMES, 2000). Por esse motivo, a creatina exerce efeitos benéficos em situações nas quais ocorrem distúrbios no metabolismo energético mitocondrial, como é o caso da doença de Parkinson (PERSKY e BRAZEAU, 2001), e em casos de atividades que demandam alta disponibilidade de energia, como é o caso dos músculos durante o exercício físico. Neste caso, a suplementação com creatina aumenta a síntese de ATP durante o exercício e aperfeiçoa a taxa de re-síntese de PCr durante a recuperação (SNOW *et al.*, 1998).

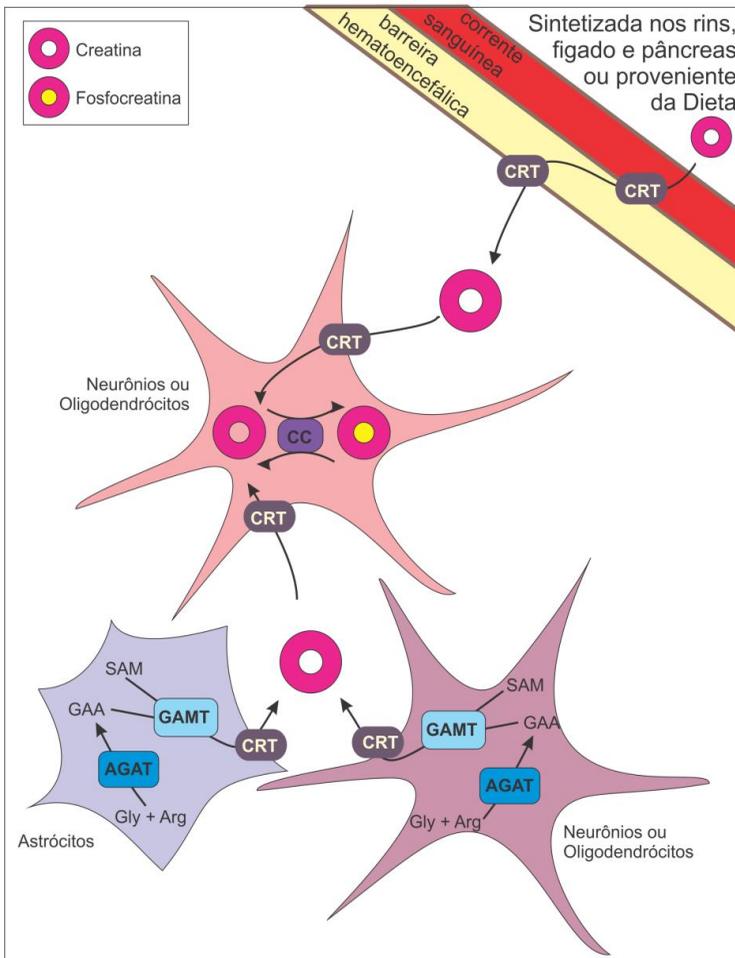


Figura 3. A creatina no Sistema Nervoso Central. A creatina pode ser sintetizada em astrócitos, neurônios e oligodendrócitos. A enzima glicinaamidinotransferase (AGAT) catalisa a conversão de glicina e arginina a ácido guanidinoacetato (GAA). A partir do GAA, a enzima glicina-M-metiltransferase (GAMT) utiliza um grupo metil doado pela S-adenosilmetionina (SAM) e forma a creatina. Ela vai para o meio extracelular através de transportadores específicos (CRTs) e atuar em outros neurônios. A creatina sintetizada periféricamente ou proveniente da dieta ultrapassa a barreira hematoencefálica e chega ao encéfalo. Dentro de neurônios, a creatina pode ser interconvertida em fosfocreatina de acordo com a demanda energética, pela enzima creatina cinase (CC).

A grande quantidade de CC encontrada no hipocampo e córtex frontal evidencia a importância da creatina no desenvolvimento cerebral e funções cognitivas (KALDIS *et al.*, 1996). Além disso, a suplementação com creatina em indivíduos saudáveis reduziu a fadiga cerebral consequente de um esforço mental estressante e em indivíduos com deficiência na ingestão de creatina, como vegetarianos e veganos, o uso de creatina melhorou a memória de trabalho e os escores de inteligência (WATANABE, KATO e KATO, 2002; RAE *et al.*, 2003). Adicionalmente, em indivíduos idosos, a suplementação com creatina por uma semana compensou o declínio cognitivo decorrente do avanço da idade com melhora na memória verbal e espacial de curto prazo e memória de longo prazo (MCMORRIS *et al.*, 2007). Os efeitos positivos da creatina no comportamento cognitivo podem estar relacionados a situações de estresse em que o indivíduo apresenta baixa nas reservas de PCr, já que a creatina não altera a performance de indivíduos normais em uma bateria de testes neurocognitivos como ocorre com indivíduos vegetarianos, veganos, estressados, desprovidos de sono e outras atividades que reduzem os níveis de PCr (WATANABE, KATO e KATO, 2002; RAE *et al.*, 2003; MCMORRIS *et al.*, 2006; RAWSON *et al.*, 2008).

Estudos do nosso grupo demonstram mecanismos pelos quais a creatina possui um efeito tipo-antidepressivo em camundongos. Em estudos de nosso grupo, a administração aguda de creatina em camundongos apresentou efeito tipo-antidepressivo em um teste preditivo e, a partir de protocolos de reversão utilizando inibidores da síntese de dopamina, α -metil-p-tirosina, e de serotonina, p-clorofenilalanina, constatou-se que este efeito envolve os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (CUNHA *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2013c; CUNHA *et al.*, 2013d). Além disso, o efeito tipo-antidepressivo da creatina demonstra estar associado à ativação de receptores α 1-adrenoceptores e pode ser mediado por uma interação com receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (CUNHA *et al.*, 2013d). Os efeitos neuroprotetores da creatina parecem envolver a ativação de vias de sinalização intracelular mediadas por PKA, PKC, CAMKII, PI3K e ERK (DELDICQUE *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2013a).

1.4 Testes Comportamentais

1.4.1 *Teste do Nado Forçado*

O teste do nado forçado (TNF) e o teste da suspensão pela cauda (TSC) são os testes preditivos mais utilizados para identificação da atividade antidepressiva de diferentes compostos. Descrito primeiramente por Porsolt, Bertin e Jalfre (1977), o TNF é baseado na observação de que os animais submetidos a uma situação inescapável, após um período de agitação inicial, adotam uma postura de imobilidade, exercendo movimentos necessários somente para manter a cabeça acima da água. Esse comportamento é relacionado com a falta de motivação para escapar dessa situação estressante. O teste é dito preditivo, pois o tratamento com drogas antidepressivas diminui o tempo de imobilidade dos animais. Apesar de possuir apenas validade preditiva, o teste é amplamente utilizado devido à fácil execução, boa reprodutibilidade e sensibilidade a diferentes classes de medicamentos antidepressivos (CRYAN e LUCKI, 2000).

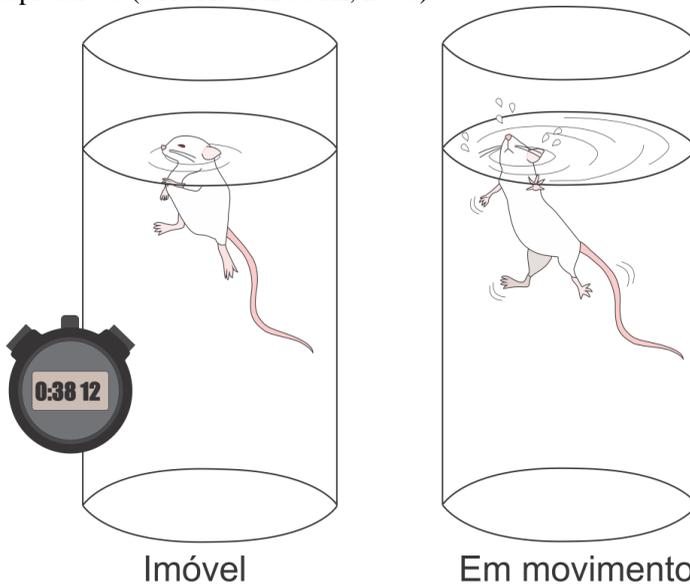


Figura 4: Teste do Nado Forçado, teste preditivo de ação antidepressiva. O animal é colocado dentro de um cilindro com água e o tempo de imobilidade, onde o animal exerce movimentos necessários somente para manter a cabeça acima da água, é cronometrado.

1.4.2 Teste do Campo Aberto

Desenvolvido por Hall (1936), o teste do campo aberto é utilizado como uma ferramenta de avaliação da atividade locomotora dos animais. No TNF, a diminuição do tempo de imobilidade pode tanto ser reflexo de um efeito tipo-antidepressivo como de um efeito de estimulação locomotora. Para excluir a possibilidade de que os compostos atuem sobre o sistema locomotor e confirmar a ação antidepressiva dos compostos e terapias analisadas, os animais são submetidos ao TCA após os TNF ou TSC. Para isso, são colocados em uma arena quadriculada e o número de quadrantes cruzados com as 4 patas é registrado.

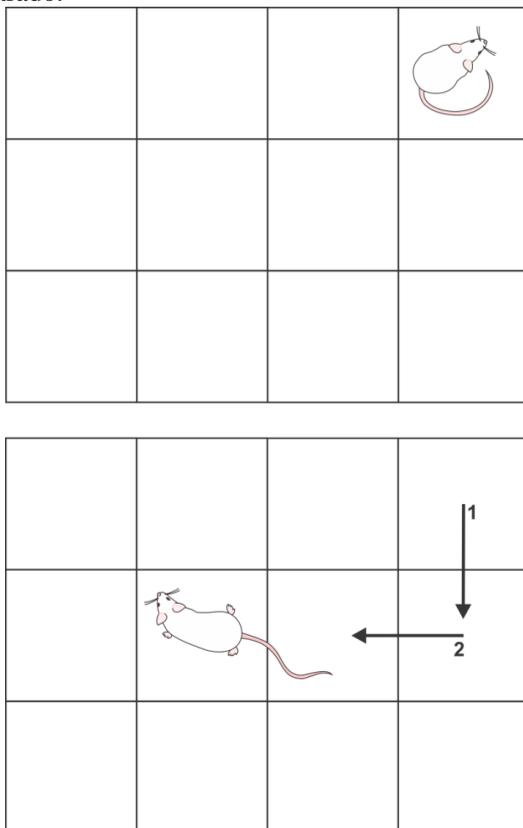


Figura 5: Teste do Campo Aberto, teste de avaliação locomotora. Os animais são colocados dentro de uma arena quadriculada e o número de cruzamentos com as 4 patas é registrado.

2. JUSTIFICATIVA

Nosso grupo demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo da creatina em camundongos envolve a participação dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (CUNHA *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2013c; CUNHA *et al.*, 2013d), a ativação de receptores $\alpha 1$ -adrenoceptores e receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT1a (CUNHA *et al.*, 2013d). Além disso, também demonstramos que o efeito tipo-antidepressivo da atividade física é dependente de dopamina, serotonina e ativação das vias da PKA e CAMKII (CUNHA *et al.*, 2013d).

Os tratamentos farmacológicos disponíveis para o tratamento da depressão demandam semanas para surtir efeito. Além disso, as terapias atuais com compostos antidepressivos produzem vários efeitos adversos dependentes da dose e uma taxa significativa de pacientes não apresentam responsividade aos fármacos. Assim, há uma constante necessidade de desenvolver terapias alternativas de ação mais rápida, segura e efetiva para o tratamento da depressão (BERTON e NESTLER, 2006).

Portanto, é relevante aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na ação antidepressiva da creatina e investigar os possíveis efeitos da sua associação com o exercício físico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito tipo-antidepressivo da terapia combinada de creatina com exercício físico e avaliar a expressão de neurotrofinas no hipocampo de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito tipo-antidepressivo do tratamento crônico por 14 dias com creatina ou fluoxetina;
- Analisar amostras do hipocampo dos animais tratados com creatina ou fluoxetina para verificar o imunoconteúdo e a expressão gênica de neurotrofinas (BDNF, VEGF e FGF-2);
- Verificar o efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao exercício físico por 14, 21 e 28 dias;
- Investigar o efeito tipo-antidepressivo do tratamento crônico (14 dias) com creatina ou fluoxetina em combinação com exercício físico realizado por 14 dias;
- Analisar amostras do hipocampo de animais tratados com creatina ou fluoxetina em combinação com exercício físico para determinar o imunoconteúdo e a expressão gênica de neurotrofinas (BDNF, VEGF e FGF-2)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Drogas e Compostos utilizados

Neste trabalho foram utilizadas creatina monohidratada (Amerifit, USA) e cloridrato de fluoxetina (Teuto/Pfizer, Brasil), administradas por via oral (p.o.). Água foi o veículo utilizado em todos os protocolos.

4.2 Animais

Camundongos *Swiss* adultos (60 dias) machos (40-50 g), foram mantidos em condições padrão de laboratório com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA – PP00795).

4.2.1 *Tratamento com creatina ou fluoxetina*

Com o objetivo de obter uma curva dose-resposta de creatina ou fluoxetina, os animais foram tratados diariamente com fluoxetina (doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg), com creatina (doses de 0,01, 0,1 ou 1 mg/kg), ou veículo durante 14 dias. Decorridas 24 horas do último tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, para avaliação de comportamento tipo-antidepressivo e da atividade locomotora. As doses de creatina tiveram como base os dados prévios de nosso grupo (CUNHA *et al.*, 2012).

4.2.2 *Exercício físico*

Para a realização destes experimentos, foi utilizada uma esteira apropriada para camundongos (adquirida da Insight, modelo EP 132). Uma semana antes do início dos tratamentos, os camundongos foram ambientados na esteira. Depois, os animais foram distribuídos de forma aleatória em grupos experimentais: “exercitados”, com a esteira em funcionamento, e “sedentários”, com a esteira desligada. Os animais “exercitados” foram submetidos ao exercício físico (forçado) na esteira por 40 minutos/dia durante 14, 21 ou 28 dias, com uma velocidade inicial de 6 metros/minuto, aumentando 2 metros/minuto por semana.

Os animais “sedentários” foram manuseados e tratados pelo mesmo período de tempo.

4.2.3 Terapia combinada de exercício físico com creatina ou fluoxetina

Os animais foram previamente ambientados à esteira por uma semana e depois exercitados durante 14 dias por 40 minutos/dia, numa velocidade de 6 metros/minuto na primeira semana e 8 metros/minuto na segunda semana. Os animais sedentários foram colocados na esteira desligada pelo mesmo período de tempo. Concomitantemente ao exercício físico, foram administradas diariamente doses subativas de creatina, fluoxetina ou veículo por via oral. Após 24 horas do último tratamento os animais foram submetidos aos testes comportamentais.

4.3 Testes comportamentais

4.3.1 Teste do Nado Forçado (TNF)

Os animais foram colocados em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, trocada a cada animal, à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os camundongos foram considerados imóveis quando flutuavam ou faziam apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. O tempo de imobilidade (em segundos) foi cronometrado durante 6 minutos.

4.3.2 Teste do Campo Aberto (TCA)

O teste foi realizado de acordo com Hall (1936), onde os animais são colocados dentro de uma caixa de dimensões 40x60x50 cm, com 12 quadrantes iguais riscados na base. O número de quadrantes cruzados com as 4 patas pelos animais foi registrado durante 6 minutos. Drogas que estimulam a atividade locomotora aumentam o número de cruzamentos, enquanto drogas com potencial sedativo diminuem o número de cruzamentos. A limpeza do aparato foi realizada com álcool 10% entre as sessões.

4.4 Análise da expressão de neurotrofinas

Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram decapitados e os hipocampos dissecados e armazenados em freezer - 80°C para posterior análise bioquímica.

4.4.1 Imunodeteção de proteínas

Os hipocampos dos animais foram homogeneizados em tampão de lise e as amostras analisadas por *Western Blott*, de acordo com protocolo descrito em trabalho realizado pelo nosso grupo (MORETTI *et al.*, 2013). As proteínas foram submetidas a uma eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. As proteínas foram identificadas através de anticorpos específicos (Santa Cruz): anti-BDNF (1:1000), VEGF (1:500) e FGF-2 (1:500). As bandas de proteínas foram reveladas através de reagente de ECL (anticorpos secundários ligado a peroxidase) ou pela coloração NBT/BCIP (anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina). As bandas de proteínas foram quantificadas por densitometria utilizando β -actina (Abcam, 1:1000) como controle padrão da aplicação de proteínas. O anti-BDNF detecta a forma madura da proteína BDNF. Os resultados foram expressos como porcentagem da razão proteína/ β -actina em relação ao grupo controle.

4.4.2 Avaliação da expressão gênica (RNAm)

A expressão gênica (RNA mensageiro) de BDNF, VEGF e FGF-2, foi determinada através de “real-time” PCR quantitativo (qRT-PCR) como descrito por Engel e colaboradores (2013). Os hipocampos dos animais foram homogeneizados em tampão de lise e o RNA total foi extraído com o kit “SV Total RNA Isolation” da marca Promega (Madison, WI, USA). Cerca de 400 a 500 ng de RNA total foi utilizado na síntese de cDNA, utilizando o kit “Taqman Reverse Transcriptase” (Applied Biosystems) e a enzima Transcriptase Reversa (Multiscribe II). A reação foi realizada num Termociclador (Eppendorf), de acordo com o seguinte protocolo: 25°C por 10 minutos para o “primer annealing”, 48°C durante 1 hora para síntese e 95°C por 5 minutos para inativação da enzima, seguindo as instruções do manual do produto. O qRT-PCR foi realizado num equipamento ABI PRISM série 7900 da Applied Biosystems (no Laboratório Multiusuários do CCB), utilizando cerca de

10-100 ng de cDNA e o kit “Power SYBR Green PCR Master Mix” da Applied Biosystems, na presença de 0,5 μ M de primers “forward” (F) ou “reverse” (R). Os “primers” foram desenhados utilizando o programa PrimerExpress (da Applied Biosystems). A reação de RT-PCR foi realizada com o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos (incubação), 95°C por 10 minutos (ativação da Taq polimerase), seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto. Para cada amostra, a expressão dos genes foi quantificada utilizando uma curva-padrão de cDNA de lisado celular total. Os resultados foram normalizados pela expressão de genes “padrões” (housekeeping genes) de β -actina (ACTB).

4.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme o protocolo experimental, seguidos de teste *post hoc* de Duncan. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo do efeito tipo-antidepressivo da administração crônica de creatina e fluoxetina

5.1.1 *Curvas dose-resposta do tratamento com creatina por 14 dias no TNF e no TCA*

Como mostrado na Figura 6 (A), os tratamentos com creatina nas doses de 0,1 e 1 mg/kg (p.o.), mas não na de 0,01 mg/kg, reduziram o tempo de imobilidade no TNF, demonstrando um efeito tipo-antidepressivo. Estas doses não provocaram alterações na atividade locomotora, quando avaliadas pelo TCA (B).

Para avaliar o efeito sinérgico da terapia combinada de exercício físico com creatina, foi utilizada a dose subativa de 0,01 mg/kg.

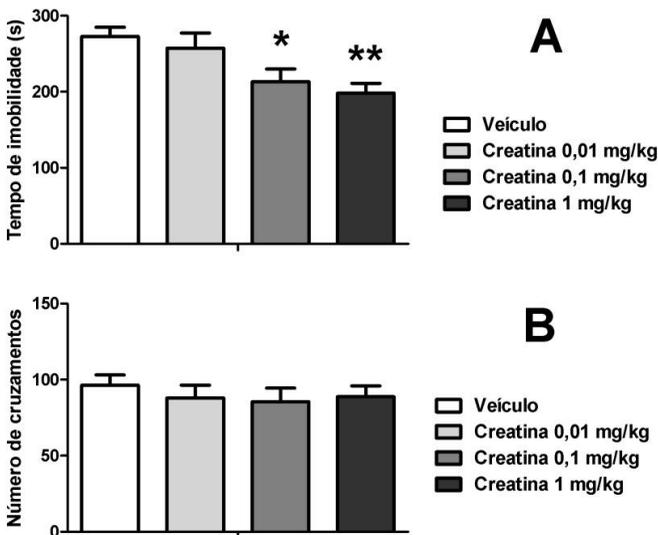


Figura 6. Efeito do tratamento com creatina por 14 dias nas doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg (p.o.) no TNF (A) e no TCA (B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Duncan. *P < 0,05; **P < 0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo.

A) $F(3,24)=5,024$, $p<0,01$

B) $F(3,24)=0,3591$, $p=0,783$

5.1.2 *Curvas dose-resposta do tratamento com fluoxetina por 14 dias no TNF e no TCA*

A Figura 7 (A) mostra que o tratamento com fluoxetina nas doses de 1 e 10 mg/kg (p.o.), mas não a de 0,1 mg/kg, diminuíram o tempo de imobilidade dos animais no TNF. Estas doses não alteraram a atividade locomotora dos animais, analisadas pelo TCA (B).

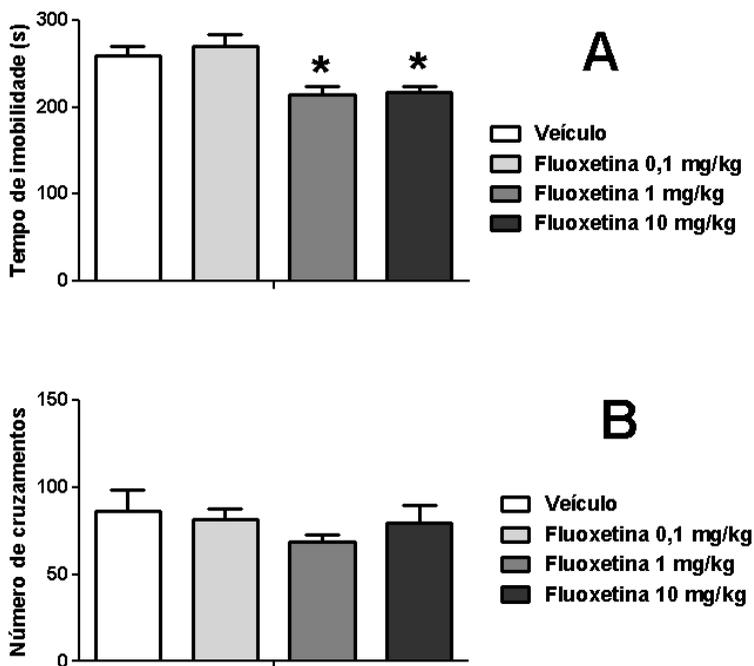


Figura 7. Efeito do tratamento com fluoxetina por 14 dias nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (p.o.) no TNF (A) e no TCA (B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Duncan. *P < 0,05 em relação ao grupo tratado com veículo.

A) $F(3,24)=6,719, p<0,01$

B) $F(3,24)=0,7516, p=0,532$

Para avaliar o efeito sinérgico da terapia combinada de exercício físico com fluoxetina, foi utilizada a dose subativa de 0,1 mg/kg.

5.1.3 Comparação entre o tratamento crônico com creatina ou com fluoxetina

A Figura 8 (A) mostra que os tratamentos com fluoxetina (10 mg/kg) ou creatina (1 mg/kg) por 14 dias, reduziram o tempo de imobilidade dos animais no TNF. Além disso, os dados mostram que a creatina numa dose 10 vezes menor apresentou um melhor efeito do que o tratamento com fluoxetina. As doses não alteraram a atividade locomotora dos animais (B).

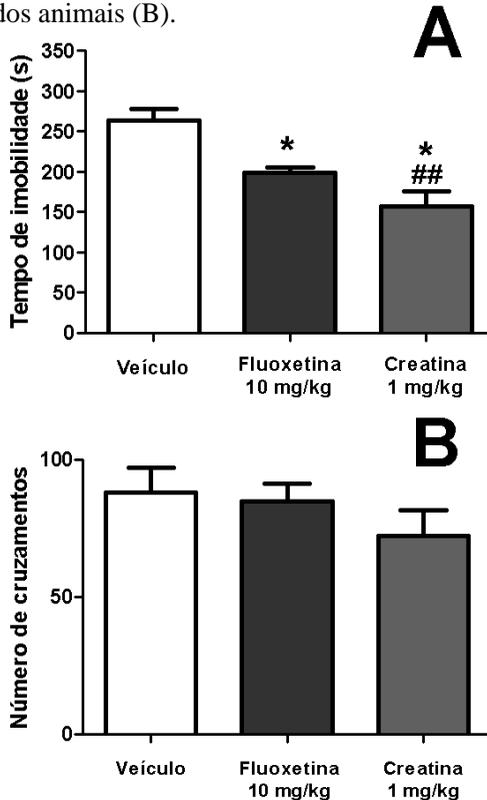


Figura 8. Efeito do tratamento com fluoxetina (10mg/kg) ou creatina (1mg/kg) por 14 dias (p.o.) no TNF (A) e no TCA (B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 8-10). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Duncan. *P < 0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo; ##P < 0,01 em relação ao grupo tratado com fluoxetina.

A) $F(2,23)=15,175$ $p<0,01$

B) $F(2,23)=0,946$ $p=0,4028$

5.2 Efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou creatina sobre o imunoconteúdo de neurotrofinas no hipocampo

5.2.1 BDNF

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram que ambos os tratamentos com fluoxetina (10 mg/kg) e com creatina (1 mg/kg) aumentaram o imunoconteúdo de BDNF hipocampal com relação ao grupo tratado somente com veículo.

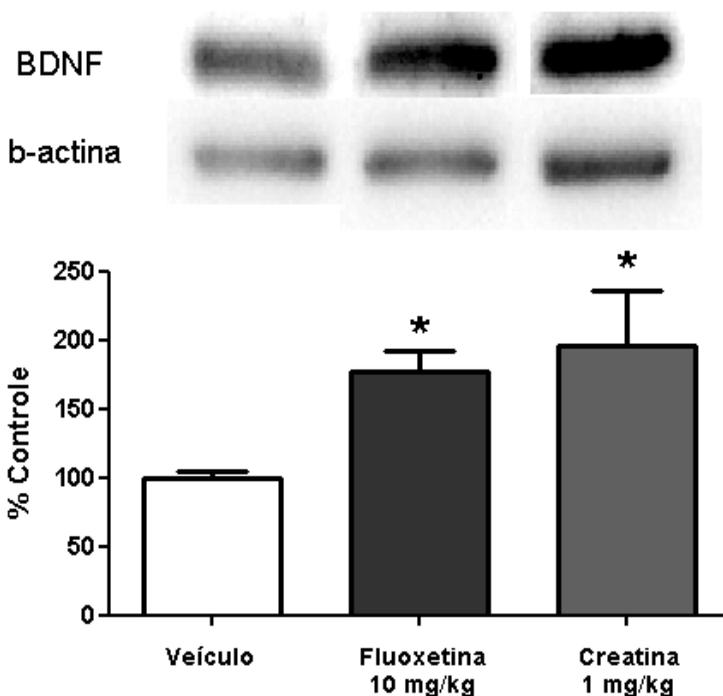


Figura 9. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) no imunoconteúdo de BDNF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 5-6). *P < 0,05 quando comparado aos animais controle. Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,13)=5,071$ $p<0,05$.

5.2.2 VEGF

Com relação ao imunoconteúdo de VEGF hipocampal, a Figura 10 mostra que os tratamentos com fluoxetina ou creatina por 14 dias não promoveram alterações no imunoconteúdo desta neurotrofina.

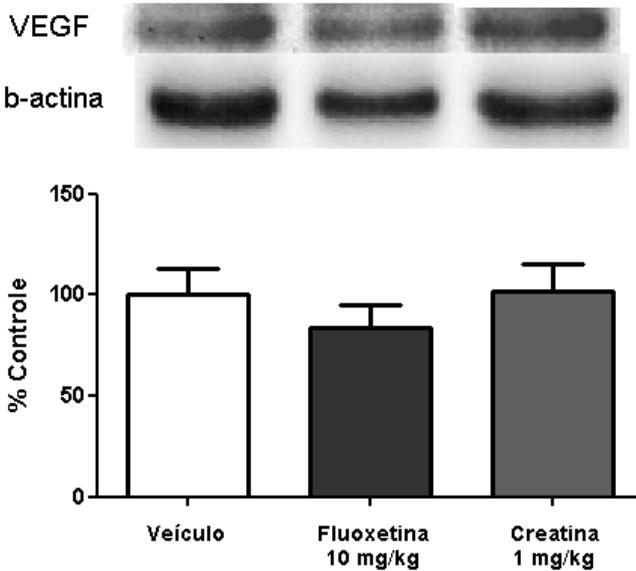


Figura 10. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) no imunoconteúdo de VEGF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 7-8). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,19)=0,569$ $p=0,575$

5.2.3 FGF-2

A Figura 11 mostra que os tratamentos crônicos com fluoxetina ou com creatina não alteraram o imunocnteuído de FGF-2 no hipocampo.

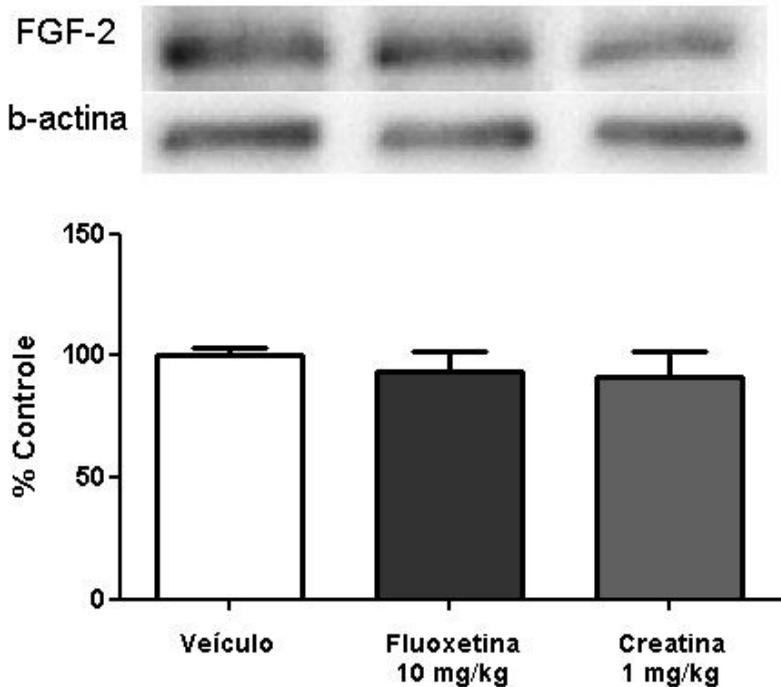


Figura 11. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) no imunocnteuído de FGF-2 no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 6). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,15)=0,3386$ $p=0,718$

5.3 Efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou creatina sobre a expressão gênica de neurotrofinas no hipocampo

5.3.1 BDNF

A análise por qRT-PCR demonstrou que o tratamento com fluoxetina, mas não com creatina, foi capaz de aumentar significativamente a expressão gênica (RNAm) de BDNF no hipocampo (Figura 12).

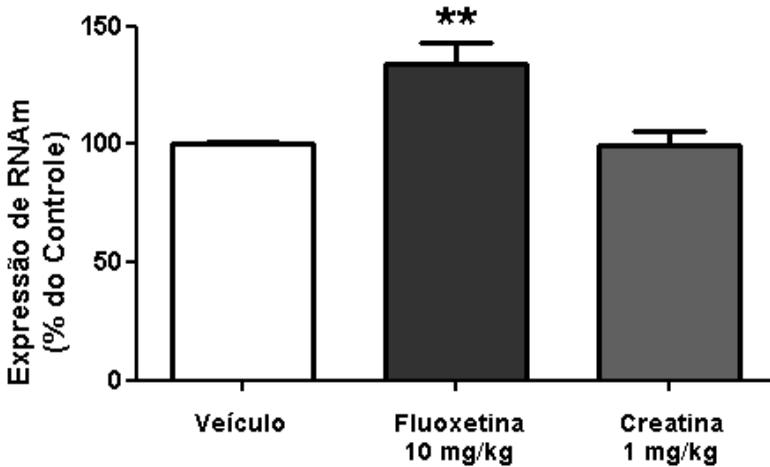


Figura 12. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de BDNF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 4). **P < 0,01 quando comparado aos animais controle. Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,9)=10,599$ $p<0,01$

5.3.2 VEGF

Os resultados da Figura 13 mostram que os tratamentos por 14 dias com fluoxetina ou creatina não alteraram a expressão gênica hipocampal de VEGF em relação aos animais submetidos somente ao exercício físico.

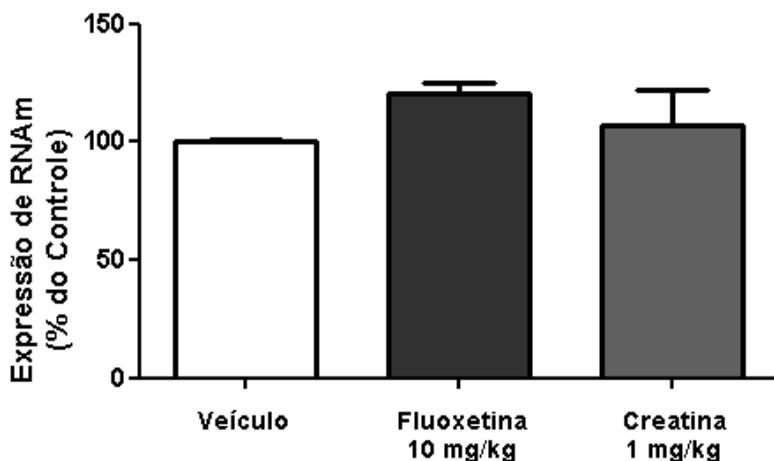


Figura 13. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de VEGF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 4-6). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,12)=1,343$ $p=0,297$

5.3.3 FGF-2

Como mostra a Figura 14, o tratamento com fluoxetina ou creatina por 14 dias, não alterou a expressão gênica de FGF-2.

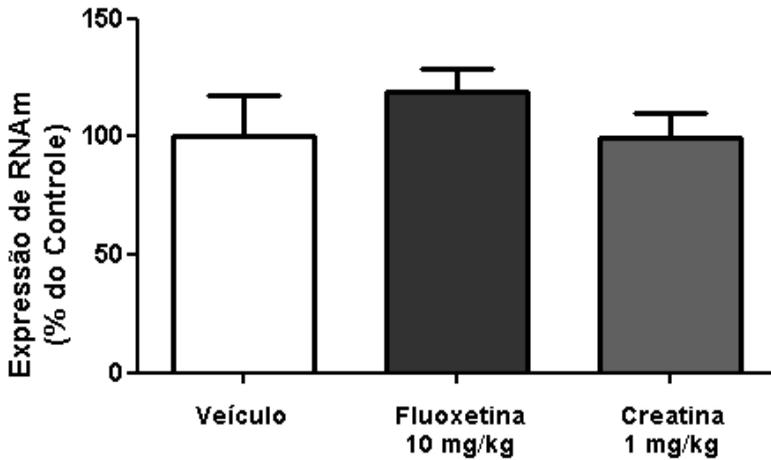


Figura 14. Efeito do tratamento crônico por 14 dias com fluoxetina, creatina ou veículo (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de FGF-2 no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 4-6). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,11)=0,934$ $p=0,422$

5.4 Estudo da terapia combinada de exercício físico com creatina ou fluoxetina: efeito tipo-antidepressivo e expressão de neurotrofinas

5.4.1 *Curva tempo-resposta do efeito tipo-antidepressivo do exercício físico*

Os resultados mostram que o exercício físico realizado por camundongos durante 21 e 28 dias produziu uma redução significativa no tempo de imobilidade no TNF, em relação aos animais sedentários de cada período (Figura 15, A). Os tratamentos por esses períodos não alterou a atividade locomotora dos animais testados no TCA (Figura 15, B). Os dados indicam que o exercício físico por 14 dias não foi suficiente para produzir uma ação tipo-antidepressiva. Para avaliar o efeito sinérgico da terapia combinada de exercício físico com creatina ou fluoxetina, o presente trabalho utilizou o período subativo de 14 dias.

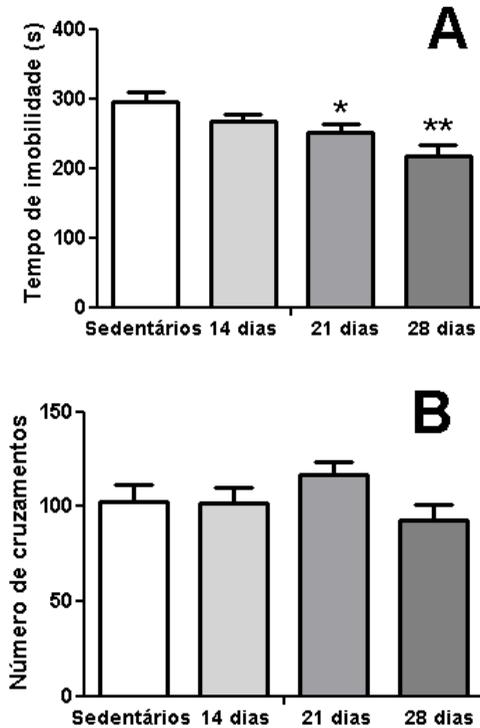


Figura 15. Efeito do exercício físico por 14, 21 ou 28 dias no TNF (A), e no TCA (B), em camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 7-8). *P < 0,05; **P < 0,01 quando comparado aos animais sedentários. Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

A) $F(3,27)=5,609, p<0,01$

B) $F(3,27)=1,335, p=0,284$

5.4.2 *Efeito tipo-antidepressivo sinérgico da terapia combinada de exercício físico com fluoxetina ou creatina*

A Figura 16 (A) mostra que os tratamentos com fluoxetina ou creatina (em doses subativas) em combinação com exercício físico, por um período de tempo que não apresenta efeito tipo-antidepressivo, reduziram significativamente o tempo de imobilidade dos camundongos no TNF, em comparação com os animais sedentários. A figura 16 B

mostra que os tratamentos não afetaram a atividade locomotora dos animais.

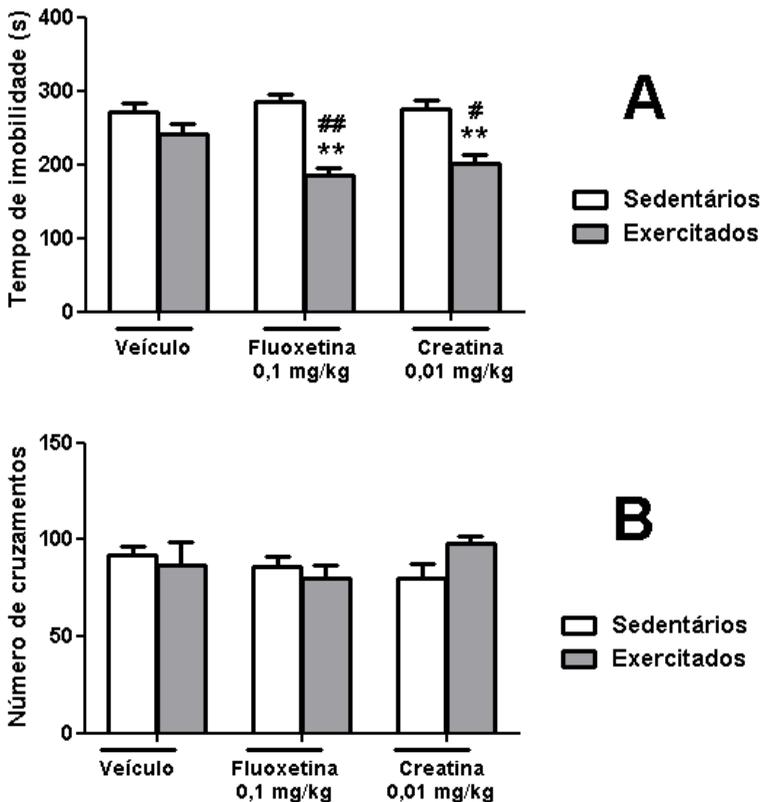


Figura 16. Efeito do exercício físico combinado por 14 dias com fluoxetina ou creatina (p.o) no TNF (A) e no TCA (B), em camundogos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 8-10). **P < 0,01 quando comparado aos animais sedentários/veículo; #P < 0,05 e ##P < 0,01 quando comparados aos animais exercitados/veículo. Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

- A) Exercício Físico: $F(1,48) = 49,308$; $p < 0,01$
 Tratamento: $F(2,48) = 1,727$; $p = 0,189$
 Interação: $F(2,48) = 4,332$; $p < 0,05$
- B) Exercício Físico: $F(1,48) = 0,1712$; $p = 0,681$
 Tratamento: $F(2,48) = 0,5238$; $p = 0,596$
 Interação: $F(2,48) = 1,8283$; $p = 0,172$

5.5 Efeito do tratamento combinado de exercício físico e fluoxetina ou creatina sobre o imunocontéudo de neurotrofinas no hipocampo

5.5.1 BDNF

Os resultados representados na Figura 17 mostram que a terapia combinada de exercício físico com creatina durante 14 dias promoveu um aumento significativo no imunocontéudo de BDNF no hipocampo de camundongos. A terapia combinada de exercício físico com fluoxetina não alterou a expressão de BDNF.

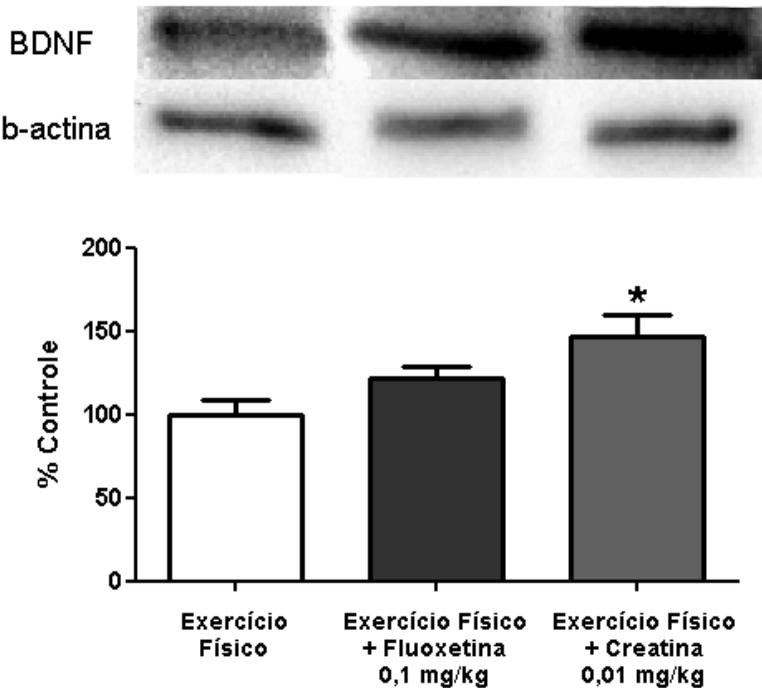


Figura 17. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina ou creatina (p.o.) no imunocontéudo de BDNF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 5). *P < 0,05 quando comparado aos animais submetidos somente ao exercício físico. Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,12)=5,011$ $p<0,05$

5.5.2 VEGF

A Figura 18 mostra o imunocnteúdo de VEGF hipocampal em camundongos submetidos ao exercício físico combinado com fluoxetina ou creatina durante 14 dias. Os tratamentos não alteraram o imunocnteúdo de VEGF.

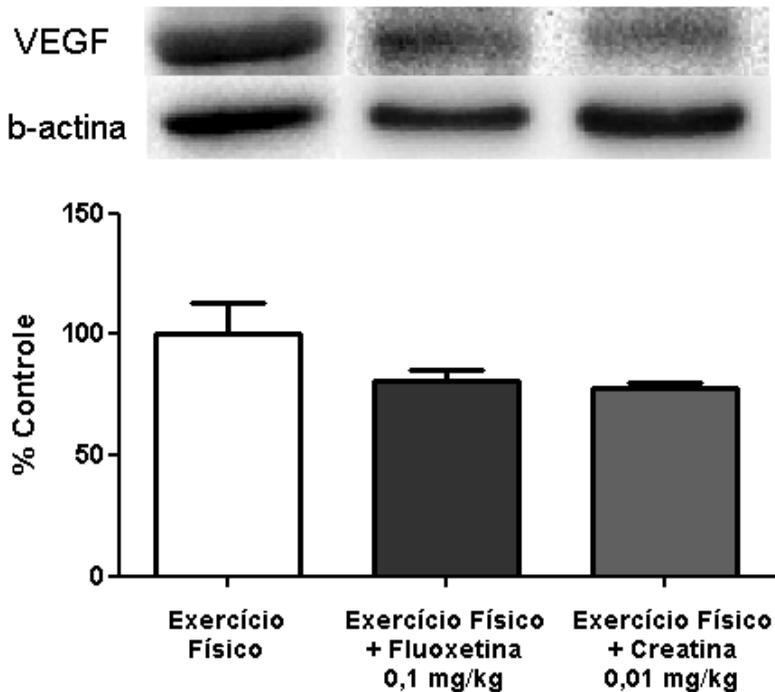


Figura 18. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina ou creatina (p.o.) no imunocnteúdo de VEGF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 6). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,15)=2,1350$, $p=0,153$

5.5.3 FGF-2

Os dados apresentados na Figura 19, mostram que ambos os tratamentos combinados de exercício físico com fluoxetina ou creatina não promoveram alterações no imunoc conteúdo de FGF-2 no hipocampo de camundongos.

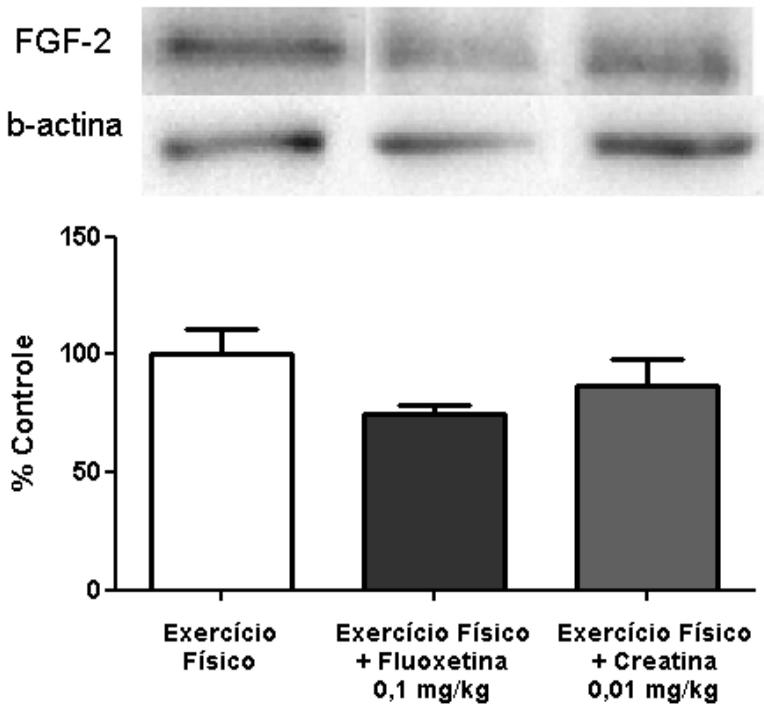


Figura 19. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina ou creatina (p.o.) no imunoc conteúdo de FGF-2 no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 5-6). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,14)=1,7913$, $p=0,203$

5.6 Efeito do tratamento combinado de exercício físico e fluoxetina ou creatina sobre a expressão gênica de neurotrofinas no hipocampo

5.6.1 BDNF

Como ilustrado na Figura 20, a terapia combinada de exercício físico e creatina por 14 dias induziu um efeito sinérgico aumentando a expressão gênica (RNAm) hipocampal de BDNF, quando comparado com o grupo de animais submetidos somente ao exercício físico.

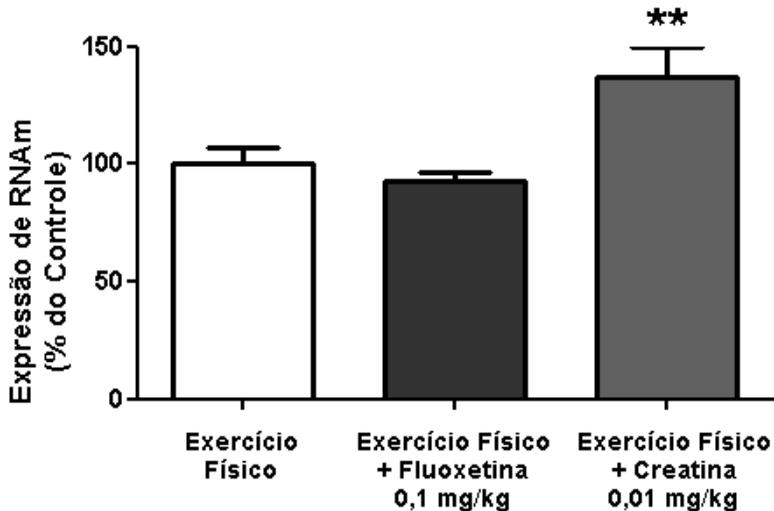


Figura 20. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina ou creatina (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de BDNF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 6). **P < 0,01 quando comparado aos animais submetidos somente ao exercício físico. Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,15)=7,604$ $p<0,01$

5.6.2 VEGF

Excepcionalmente, houve uma diferença entre a expressão gênica de VEGF hipocampal dos animais sedentários em relação aos animais submetidos somente ao exercício físico subativo (dados não mostrados, $F(1,9)=12,4180$ $p<0,01$), o que não foi observado em outras neurotrofinas (dados não mostrados).

A Figura 21 mostra os dados referentes à expressão gênica de VEGF hipocampal dos grupos submetidos à terapia combinada de exercício físico com fluoxetina ou creatina em doses subativas. Nenhuma das terapias foi eficaz em alterar a expressão gênica dessa neurotrofina em relação aos animais submetidos somente ao exercício físico.

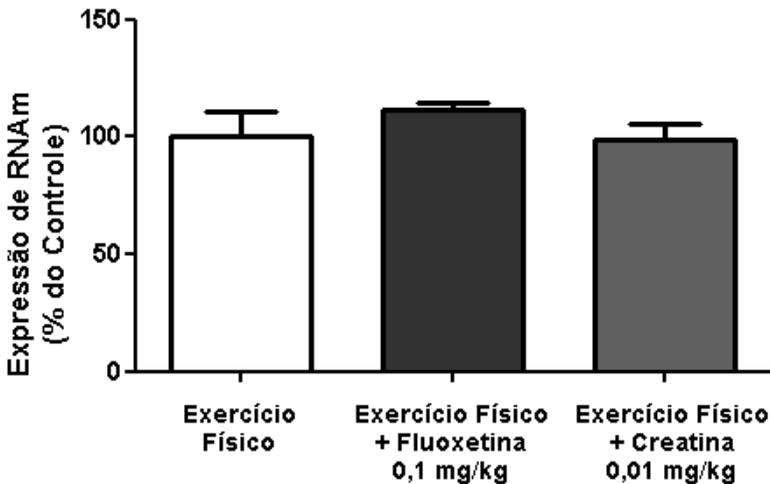


Figura 21. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina ou creatina (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de VEGF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 4). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,9)=0,8905$ $p=0,444$

5.6.3 FGF-2

A Figura 22 mostra que as terapias combinadas de exercício físico com fluoxetina ou com creatina por 14 dias não alteraram a expressão gênica hipocampal de VEGF, em relação ao grupo controle, submetido somente ao exercício físico.

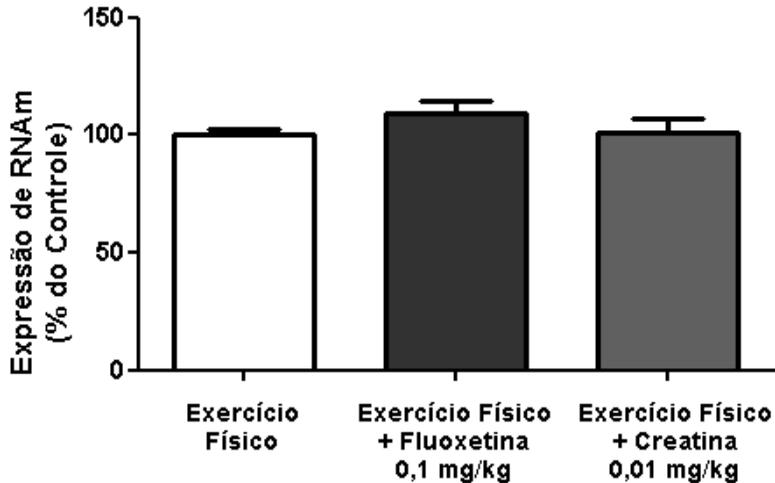


Figura 22. Efeito do tratamento combinado por 14 dias de exercício físico com fluoxetina ou creatina (p.o.) na expressão gênica (RNAm) de VEGF no hipocampo de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M (N = 4-6). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan. $F(2,11)=0,879$ $p=0,442$

6. DISCUSSÃO

Numa primeira etapa, este trabalho avaliou o efeito tipo-antidepressivo do tratamento crônico de camundongos com creatina durante 14 dias, em comparação com o mesmo período de tratamento com fluoxetina. Assim, foi demonstrado que: a) o tratamento crônico com creatina por 14 dias apresenta efeito tipo-antidepressivo no TNF nas doses de 0,1 e 1 mg/kg, mas não na dose de 0,01 mg/kg; b) o tratamento com creatina por 14 dias na dose de 1 mg/kg apresenta efeito tipo-antidepressivo aparentemente mais efetivo do que a fluoxetina, na dose de 10 mg/kg. Para investigar um dos possíveis fatores envolvidos no efeito tipo-antidepressivo da creatina, a expressão proteica (imunoconteúdo) e gênica (RNAm) de neurotrofinas foram avaliados no hipocampo de camundongos. Os dados deste trabalho mostraram que: a) o tratamento com creatina por 14 dias induziu um aumento no imunoconteúdo de BDNF; b) o tratamento com fluoxetina aumentou o imunoconteúdo e a expressão gênica de BDNF; c) os tratamentos não afetaram o imunoconteúdo ou a expressão gênica de VEGF e FGF-2.

Considerando que o exercício físico apresenta um efeito tipo-antidepressivo e que os efeitos adversos observados pelo tratamento prolongado com alguns antidepressivos são dependentes da dose, num segundo momento este trabalho avaliou se o tratamento crônico com doses subativas de fluoxetina ou creatina apresenta efeito quando combinado com o exercício físico (forçado) em um período subativo. Os resultados revelaram que: a) o exercício físico por 21 e 28 dias, mas não por 14 dias, apresenta efeito tipo-antidepressivo; b) a terapia combinada de exercício físico com fluoxetina ou creatina (ambas em doses subativas) por 14 dias induziu um efeito tipo-antidepressivo sinérgico; c) a terapia combinada de exercício físico com creatina foi capaz de aumentar o imunoconteúdo e a expressão gênica de BDNF hipocampal, mas não de VEGF e FGF-2; d) a terapia combinada de exercício físico com fluoxetina não afetou a expressão dessas neurotrofinas.

Para avaliar o potencial antidepressivo de diferentes compostos, o Teste do Nado Forçado (TNF) e o Teste de Suspensão pela Cauda (TSC) são amplamente utilizados. Esses testes se baseiam no fato de que antidepressivos clássicos são capazes de diminuir o tempo de imobilidade dos animais submetidos a uma situação inescapável (MCARTHUR e BORSINI, 2006). O TNF, apesar de possuir validade somente preditiva, é muito utilizado por ser de fácil execução, bem

reprodutível e sensível a diferentes antidepressivos, como os ISRS, os tricíclicos, os inibidores da enzima monoamina oxidase e os atípicos (CRYAN e LUCKI, 2000; PETIT-DEMOULIERE, CHENU e BOURIN, 2005). Apesar disso, compostos que possuem atividade psicoestimulante podem resultar em uma diminuição do tempo de imobilidade no TNF e assim gerar um resultado falso positivo. Para descartar essa possibilidade, os animais passam pelo TCA onde a sua atividade locomotora é avaliada e é possível confirmar se o efeito observado no TNF é tipo-antidepressivo (BORSINI e MELI, 1988).

Estudos clínicos e pré-clínicos envolvendo a depressão são de grande importância, uma vez que esse transtorno é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo. Os tratamentos consistem na redução dos sintomas e consequente melhora na qualidade de vida dos pacientes (TIERNEY, 2007). Mesmo os fármacos mais seletivos apresentam um elevado número de efeitos colaterais dependentes da dose, que pode acarretar a interrupção do tratamento (TRINDADE *et al.*, 1998). Pacientes depressivos em tratamento com fluoxetina apresentam variados efeitos colaterais. Esses indivíduos podem apresentar comportamento agressivo, disfunção erétil, anorgasmia e diminuição da libido, além de outros efeitos adversos mais brandos como dor de cabeça, náusea, tremores, diarreia, insônia, agitação, fotossensibilidade, boca seca e perda de peso. Além disso, a descontinuidade do tratamento pode acarretar síndrome de abstinência e aumento do risco de suicídio (WENTHUR, BENNETT e LINDSLEY, 2013; ZOU *et al.*, 2013). Assim, estudos são constantemente conduzidos na tentativa de se desenvolver terapias alternativas mais eficazes, seguras, rápidas e de custo reduzido.

Estudos prévios do nosso grupo mostraram que a administração aguda de creatina foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade dos camundongos no teste de suspensão pela cauda (CUNHA *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2013c; CUNHA *et al.*, 2013d). Para avaliar se a creatina poderia ser um tratamento alternativo viável aos tratamentos atuais, se torna necessário verificar os seus efeitos crônicos e investigar alterações bioquímicas causadas por esse tratamento no encéfalo. A fluoxetina, um antidepressivo que tem seu mecanismo de ação bem conhecido e que é largamente utilizado na terapêutica e na pesquisa, foi testado nos mesmos protocolos deste trabalho, como descrito em nossos estudos prévios (MACHADO *et al.*, 2012a; MACHADO *et al.*, 2012b; FREITAS *et al.*, 2013). Os dados mostraram que o tratamento crônico de camundongos com creatina apresentou atividade tipo-antidepressiva, confirmando que o composto *per se* possui um efeito no TNF. Além

disso, os efeitos da creatina podem ser observados em uma dose 10 vezes menor do que aquela com fluoxetina. Ao contrário dos antidepressivos e apesar de atuar em diferentes sistemas, poucos efeitos adversos são observados com a suplementação diária com creatina. Distúrbios gastrointestinais leves a moderados como diarreia, vômito e náusea, além de aumento ou diminuição do apetite, ganho de peso e desconforto estomacal foram observados clinicamente (JUNH, O'KANE e VINCI, 1999; TARNOPOLSKY, 2000; CHRUSCH *et al.*, 2001; COX *et al.*, 2002; GROENEVELD *et al.*, 2003; ASTORINO *et al.*, 2005). Os efeitos da creatina na função renal é um tópico confuso. Pacientes que fazem uso de creatina apresentam níveis elevados da creatinina no sangue, parâmetro usado como marcador de disfunção renal. Porém o aumento desse composto pode ser devido ao aumento do metabolismo da creatina (GUALANO *et al.*, 2008; WILLIS *et al.*, 2010). Allen e colaboradores (2012) mostraram que suplementação durante 5 semanas com 4% de creatina na ração de ratos potencializou o efeito tipo-antidepressivo do tratamento crônico com fluoxetina em doses ativas ou subativas no TNF. Esses autores sugerem que a creatina, ao menos em parte, compartilha mecanismos de ação com a fluoxetina (ALLEN *et al.*, 2012).

De modo geral, os antidepressivos atuam aumentando a presença de monoaminas na fenda sináptica e estas se ligam a diferentes receptores ativando cascatas de sinalização intracelular. A sinalização celular ativa fatores de transcrição no núcleo, aumentando a expressão gênica para que ocorra a síntese de proteínas, dentre as quais, as neurotrofinas. As neurotrofinas atuam, por exemplo, na divisão celular, diferenciação, migração e na sobrevivência celular. A principal neurotrofina presente no SNC é o BDNF, que tem um papel fundamental na efetividade de alguns antidepressivos. Assim, considerando os efeitos comportamentais da creatina, a etapa seguinte deste trabalho foi verificar o efeito desse composto na expressão das neurotrofinas BDNF, VEGF e FGF-2.

Corroborando com a literatura, os nossos dados mostraram que o tratamento de camundongos com fluoxetina por 14 dias induziu um aumento no imunoconteúdo e na expressão gênica (RNAm) de BDNF no hipocampo. É bem conhecido que o tratamento crônico com fluoxetina aumenta o imunoconteúdo de BDNF no hipocampo e córtex de ratos e camundongos (ENGESSER-CESAR, ANDERSON e COTMAN, 2007; HODES, HILL-SMITH e LUCKI, 2010; HODES *et al.*, 2010; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2013). A fluoxetina também

aumentou os níveis de RNAm para BDNF em astrócitos em cultura (MOLTENI *et al.*, 2006; ALLAMAN *et al.*, 2011). De modo contrário, Balu e colaboradores (2008) mostraram que o tratamento crônico com fluoxetina aumentou os níveis de BDNF no córtex de ratos, mas não no hipocampo. Também, Larsen e colaboradores (2008) não encontraram diferenças na expressão gênica dessa neurotrofina no hipocampo. As diferenças nos resultados podem ser devido a diferentes protocolos experimentais (p. ex., tempos e doses de fluoxetina). Além disso, a fluoxetina também foi capaz de reverter a diminuição de BDNF hipocampal e sua expressão gênica em ratos e camundongos submetidos a protocolos de estresse (ZHANG *et al.*, 2010; REUS *et al.*, 2012; GUMUSLU *et al.*, 2013; YI *et al.*, 2013). Um estudo de Musazzi e colaboradores (2009) demonstrou que o tratamento crônico com fluoxetina induz um aumento do imunoconteúdo de BDNF hipocampal após 1 semana de tratamento, mais rapidamente que sua expressão gênica que demandou 2 semanas para ocorrer. Isto sugere que a fluoxetina poderia estar atuando primeiramente na tradução e clivagem de pró-BDNF em BDNF, e/ou em sua liberação nos terminais sinápticos. Em um modelo de estresse em ratos, a fluoxetina apresentou um efeito tipo-antidepressivo dependente da via serotoninérgica, ativação da PKA e fosforilação do CREB, levando a um aumento da transcrição e síntese de BDNF (WANG *et al.*, 2006).

Os nossos resultados, pela primeira vez, mostram que o tratamento por 14 dias com creatina induz um aumento do imunoconteúdo de BDNF no hipocampo sem alterar a expressão gênica de BDNF. Esses dados sugerem que, no período de 14 dias de tratamento, o aumento de BDNF “maduro” induzido pela creatina seja decorrente de um evento pós-transcricional, onde o RNAm de BDNF já disponível possa estar sendo intensamente traduzido em pró-BDNF. Além disso, a creatina poderia estar atuando no aumento da atividade de enzimas proteolíticas responsáveis pela clivagem de pró-BDNF em BDNF maduro, por exemplo, na enzima ativadora de plasminogênio tecidual (tPA), etapa essencial para que o BDNF “maduro” interaja com seus receptores TrkB (LU, PANG e WOO, 2005).

O tratamento com fluoxetina aumentou a expressão de VEGF hipocampal em ratos (WARNER-SCHMIDT e DUMAN, 2007). Entretanto, nossos dados mostraram que nem creatina ou fluoxetina afetaram a expressão de VEGF. Corroborando com os nossos dados, o tratamento durante 10 dias com fluoxetina não alterou a expressão de VEGF. Foram necessários 28 dias de tratamento para que o aumento de VEGF pudesse ser observado (LESEMANN *et al.*, 2012). Os autores

sugerem que o tratamento com fluoxetina por 10 dias induziu um aumento de VEGF apenas nos nichos de células progenitoras neurais (LESEMANN *et al.*, 2012). Em nosso trabalho as análises foram realizadas no lisado de hipocampo total, mas pode ter ocorrido um aumento em sub-regiões específicas do hipocampo onde ocorre neurogênese e angiogênese. Duman e Monteggia (2006) sugerem que o declínio de BDNF e de VEGF observado em transtornos de humor como o estresse poderia causar atrofia de certas estruturas límbicas relacionadas com a depressão, e que antidepressivos reverteriam essa atrofia. Sendo assim, seria interessante avaliar a expressão de VEGF em animais submetidos a um modelo de estresse e tratados com fluoxetina ou creatina, para observar se esses compostos não seriam capazes de reestabelecer os níveis basais dessa neurotrofina.

O envolvimento do FGF-2 na depressão não está bem esclarecido. O tratamento agudo de ratos com fluoxetina não aumenta o imunocontéudo e/ou a expressão gênica de FGF-2 hipocampal (MALLEI, SHI e MOCCHETTI, 2002; MARAGNOLI *et al.*, 2004). Entretanto, o tratamento crônico de ratos por 21 dias na dose de 10 mg/kg, provocou um aumento na expressão gênica hipocampal dessa neurotrofina (MALLEI, SHI e MOCCHETTI, 2002). Dessa forma, é possível que, para observar os efeitos da creatina ou da fluoxetina na expressão de FGF-2, seja necessário aumentar o período de tratamento.

Os nossos resultados mostram que camundongos submetidos ao exercício físico (forçado) durante 21 e 28 dias apresentam um efeito tipo-antidepressivo *per se*. Estes dados são similares aos resultados prévios do nosso grupo, mostrando que a atividade física (voluntária) por 21 dias, mas não por 14 dias, apresenta efeito tipo-antidepressivo no TSC dependente dos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico (CUNHA *et al.*, 2013b). Apesar de ainda não haver um consenso sobre a duração, intensidade e frequência adequada para a terapia antidepressiva com exercício físico, recomenda-se que os indivíduos submetidos ao tratamento adotem 30 minutos de exercício físico moderado por dia, na maioria dos dias da semana (AAN HET ROT, COLLINS e FITTERLING, 2009). Estudos clínicos também mostram que o exercício físico periódico contribui para a melhora dos sintomas depressivos em pacientes com o transtorno, resistentes ou não ao tratamento, idosos e pacientes com comorbidade depressão e Alzheimer (BABYAK *et al.*, 2000; DIMEO *et al.*, 2001; MATHER *et al.*, 2002; TERI *et al.*, 2003; PILU *et al.*, 2007; MOTA-PEREIRA *et al.*, 2011). De modo geral se observa também que indivíduos praticantes de

exercício físico são menos predispostos ao desenvolvimento da depressão (CAMACHO *et al.*, 1991; LETT *et al.*, 2004).

Vários compostos são estudados para verificar se possuem um efeito antidepressivo *per se* ou se possuem efeito sinérgico com compostos ou terapias já existentes. Considerando os efeitos adversos dose-dependentes da fluoxetina, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar se o tratamento com fluoxetina em uma dose subativa, portanto que apresentaria menos efeitos colaterais, em combinação com outra terapia comprovadamente antidepressiva, o exercício-físico, formam juntos uma alternativa eficaz para o tratamento da depressão com efeitos adversos minimizados. Para investigar um possível efeito sinérgico entre compostos e terapias antidepressivas, foram escolhidas doses subativas de fluoxetina ou creatina combinadas com um período de exercício físico que não apresentou efeito tipo-antidepressivo *per se*. A terapia combinada de exercício físico com fluoxetina numa dose subativa por 14 dias apresentou um efeito tipo-antidepressivo. Isto sugere que o tratamento com fluoxetina em doses menores do que aquelas que são efetivas no tratamento da depressão, e que possivelmente causaria menos efeitos adversos em humanos, poderia ser indicada em combinação com exercício físico para substituir os tratamentos existentes. Inclusive, para minimizar alguns efeitos colaterais dos ISRS, a prática de exercício físico é indicada clinicamente (CORDIOLI, 2001; PULCINELLI e BARROS, 2010).

Outro objetivo deste trabalho foi mostrar que a terapia combinada de exercício físico com creatina também induziu um efeito tipo-antidepressivo e talvez este protocolo pudesse ser uma alternativa potencial para os atuais tratamentos. Considerando que a prática de exercício físico e a ingestão de creatina compartilham a modulação dos sistemas monoaminérgicos de serotonina, noradrenalina e dopamina, que desempenham um grande papel na fisiopatologia da depressão, as terapias em conjunto podem estar promovendo uma intervenção sinérgica eficaz através da modulação desses sistemas (CHAOULOFF, 1989; MEEUSEN e DE MEIRLEIR, 1995; CUNHA *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2013c; CUNHA *et al.*, 2013d; LIN e KUO, 2013).

A terapia combinada de exercício físico com fluoxetina não aumentou o imunoconteúdo de BDNF maduro e a expressão gênica de BDNF no hipocampo. De fato, o tratamento com fluoxetina por 21 dias na dose de 25 mg/kg foi capaz de aumentar o imunoconteúdo de BDNF, mas não foi observado um efeito aditivo desse tratamento em combinação com a atividade física (ENGESSER-CESAR, ANDERSON e COTMAN, 2007). Além disso, o tratamento por 21 dias com

fluoxetina na dose de 10 mg/kg *per se* ou em combinação com exercício físico também não alterou o imunoconteúdo de BDNF hipocampal (ENGESSER-CESAR, ANDERSON e COTMAN, 2007). Esses dados sugerem que, embora os tratamentos *per se* possam afetar a expressão de BDNF, os mecanismos pelos quais eles atuam nessa alteração podem não ser compartilhados. Considerando o resultado sinérgico no teste comportamental, pode ser sugerido que a fluoxetina compartilhe outras alterações bioquímicas com o exercício físico que resultam nesse efeito. Dessa forma, estudos são necessários para determinar por quais mecanismos ocorre o efeito sinérgico do antidepressivo com o exercício físico.

Por outro lado, a terapia combinada de exercício físico com creatina parece apresentar uma relação entre o efeito tipo-antidepressivo e o aumento da expressão gênica e do imunoconteúdo de BDNF maduro no hipocampo. O exercício físico por 7 dias aumenta a expressão gênica de BDNF hipocampal, especialmente nas regiões CA1 e CA4, e no córtex caudal (NEEPER *et al.*, 1996; RUSSO-NEUSTADT, A. A. *et al.*, 2000; VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2003). Além disso, o aumento da expressão gênica de BDNF pelo exercício físico depende dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (IVY *et al.*, 2003; GERECKE *et al.*, 2012). Assim, os resultados sugerem que esse efeito sobre o aumento de BDNF possivelmente ocorra por mecanismos de ação semelhantes à indução dessa neurotrofina pelo exercício físico, uma vez que essas terapias combinadas apresentaram um efeito sinérgico.

Os sistemas monoaminérgicos exercem um papel importante no aumento da plasticidade neuronal pelo exercício físico (MACRAE *et al.*, 1987; CHENNAOUI *et al.*, 2000; SUTOO e AKIYAMA, 2003; MATTSON, MAUDSLEY e MARTIN, 2004; SARBADHIKARI e SAHA, 2006; CHEN, H. I. *et al.*, 2008; EBRAHIMI *et al.*, 2010). Assim, o tratamento combinado de creatina e exercício físico pode estar atuando, dentre outros mecanismos, pela ativação de receptores 5-HT_{1a}, acoplados à proteína G (Figura 23). Dessa forma, a modulação dos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico ocasionada pelo exercício físico em conjunto com a creatina, possivelmente induz a ativação de vias de sinalização intracelular que culminam na transcrição e síntese de BDNF.

As terapias combinadas não afetaram a expressão de VEGF ou de FGF-2 em relação aos animais submetidos somente ao exercício físico. Entretanto, quando comparados com animais sedentários, o

exercício físico *per se* foi capaz de promover um aumento na expressão gênica de VEGF. Corroborando com nossos dados, Tang e colaboradores (2010) mostraram que o exercício físico agudo é capaz de aumentar a expressão gênica de VEGF no hipocampo de ratos. Em humanos, indivíduos depressivos submetidos ao exercício físico não apresentaram alterações no VEGF sérico e dados pré-clínicos mostraram que o exercício físico não induz essa alteração em camundongos estressados (KIUCHI, LEE e MIKAMI, 2012; VOSS *et al.*, 2013). Apesar desses resultados, esses mesmos autores mostraram que o bloqueio de Flk-1 (receptor de VEGF), previne o efeito tipo-antidepressivo do exercício físico. Eles sugerem que a modulação da angiogênese basal exercida por essa neurotrofina é necessária para a irrigação e sobrevivência de novos neurônios (KIUCHI, LEE e MIKAMI, 2012).

O exercício físico por 2 dias induz o aumento da expressão gênica de FGF-2 no hipocampo de ratos, mas esse efeito desaparece depois de 7 dias de exercício físico (GOMEZ-PINILLA, DAO e SO, 1997; GOMEZ-PINILLA, SO e KESSLAK, 1998). Além disso, não há dados na literatura que abordem o efeito dessa intervenção no imunoconteúdo dessa neurotrofina. Os dados deste trabalho sugerem que a creatina e a fluoxetina *per se*, nas doses e no período de tratamento utilizados, não modulam a expressão gênica e o imunoconteúdo de VEGF e FGF-2, logo o fato destes compostos em doses subativas não ocasionarem alterações nessas neurotrofinas quando em combinação com outra terapia reforça os resultados do primeiro protocolo realizado.

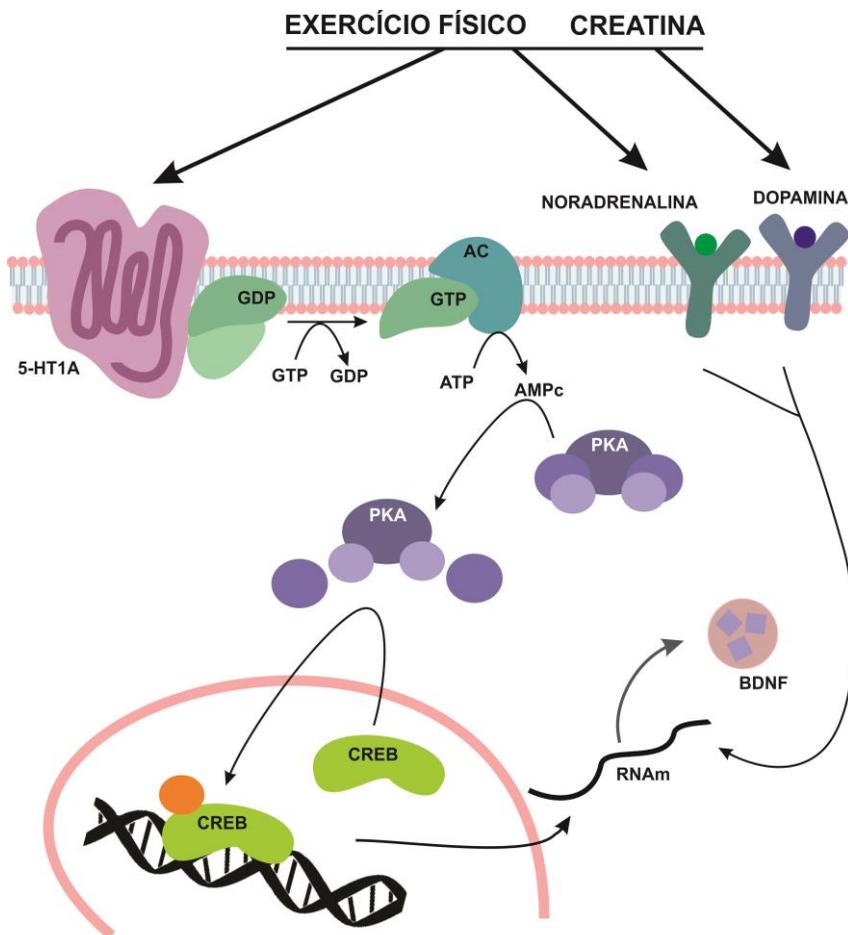


Figura 23. Possível mecanismo de ação da terapia combinada de creatina e exercício físico sobre a modulação de BDNF. A ativação de receptores 5-HT1a, acoplados a proteína G induz a formação de AMPc pela adenilil ciclase (AC). O AMPc se liga na subunidade reguladora da PKA ativando-a. A PKA fosforila CREB no núcleo, que recruta co-fatores de transcrição que estimulam a transcrição de BDNF. A modulação de BDNF também pode ocorrer devido a ativação dos receptores de dopamina e noradrenalina.

Concluindo, os dados deste trabalho indicam que a creatina é um composto com propriedades antidepressivas promissoras, agindo e modulando, pelo menos em parte, a tradução e processamento do BDNF no hipocampo. Além disso, a terapia combinada de creatina com

exercício físico, apresenta um efeito sinérgico também na síntese dessa neurotrofina. Adicionalmente, uma menor dose de fluoxetina que apresentaria menos efeitos adversos, em combinação com o exercício físico, poderia ser uma alternativa viável de tratamento de pacientes depressivos. Vale ressaltar que as terapias demonstradas neste trabalho são de fácil acesso, menor custo e podem ser utilizadas por humanos.

7. CONCLUSÕES

√ O tratamento crônico de camundongos por 14 dias com fluoxetina (1 e 10 mg/kg, p.o) e com creatina (0,1 e 1 mg/kg, p.o.) apresentou um efeito tipo-antidepressivo, sem alterar a atividade locomotora;

√ O tratamento crônico por 14 dias com creatina na dose de 1 mg/kg produziu um efeito tipo-antidepressivo mais efetivo do que a fluoxetina na dose de 10 mg/kg;

√ O tratamento crônico com creatina por 14 dias na dose de 1 mg/kg aumentou o imunoconteúdo de BDNF no hipocampo;

√ O tratamento crônico com fluoxetina por 14 dias na dose de 10 mg/kg induziu um aumento no imunoconteúdo e na expressão gênica de BDNF hipocampal;

√ O exercício físico por 21 e 28 dias apresentou um efeito tipo-antidepressivo, sem alterar a atividade locomotora;

√ O tratamento crônico por 14 dias com doses subativas de creatina ou fluoxetina combinado com exercício físico induziu um efeito tipo-antidepressivo;

√ A terapia combinada de exercício físico e dose subativa de creatina mostrou um efeito sinérgico aumentando o imunoconteúdo e a expressão gênica de BDNF hipocampal;

√ A terapia combinada de exercício físico e dose subativa de fluoxetina não alterou a expressão de neurotrofinas.

PERSPECTIVAS

- Investigar o envolvimento da enzima de clivagem de pró-BDNF, tPA, no efeito tipo-antidepressivo da creatina.
- Verificar o efeito do tratamento com creatina por diferentes períodos na expressão de diferentes neurotrofinas;
- Avaliar o efeito do tratamento com creatina na expressão de BDNF e de outras neurotrofinas em diferentes estruturas encefálicas;
- Investigar os efeitos comportamentais e bioquímicos da terapia combinada de creatina e exercício físico em um modelo animal de estresse.
- Investigar o efeito aditivo comportamental e bioquímico da terapia combinada de creatina e exercício físico em doses e períodos que possuem efeito *per se*.

9. REFERÊNCIAS

- AAN HET ROT, M.; COLLINS, K. A.; FITTERLING, H. L. Physical exercise and depression. **Mt Sinai J Med**, v. 76, n. 2, p. 204-14, Apr 2009.
- ADLARD, P. A.; PERREAU, V. M.; ENGESSER-CESAR, C.; COTMAN, C. W. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. **Neurosci Lett**, v. 363, n. 1, p. 43-8, Jun 3 2004.
- ALLAMAN, I.; FIUMELLI, H.; MAGISTRETTI, P. J.; MARTIN, J. L. Fluoxetine regulates the expression of neurotrophic/growth factors and glucose metabolism in astrocytes. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 216, n. 1, p. 75-84, Jul 2011.
- ALLEN, P. J.; D'ANCI, K. E.; KANAREK, R. B.; RENSCHAW, P. F. Sex-specific antidepressant effects of dietary creatine with and without sub-acute fluoxetine in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 101, n. 4, p. 588-601, Jun 2012.
- AMES, A., 3RD. CNS energy metabolism as related to function. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 34, n. 1-2, p. 42-68, Nov 2000.
- ANDRES, R. H.; DUCRAY, A. D.; SCHLATTNER, U.; WALLIMANN, T.; WIDMER, H. R. Functions and effects of creatine in the central nervous system. **Brain Res Bull**, v. 76, n. 4, p. 329-43, Jul 1 2008.
- ANG, E. T.; WONG, P. T.; MOOCHHALA, S.; NG, Y. K. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? **Neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 335-45, 2003.
- ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders** 2000.
- ASTORINO, T. A.; MARROCCO, A. C.; GROSS, S. M.; JOHNSON, D. L.; BRAZIL, C. M.; ICENHOWER, M. E.; KNEESSI, R. J. Is running performance enhanced with creatine serum ingestion? **J Strength Cond Res**, v. 19, n. 4, p. 730-4, Nov 2005.
- BABYAK, M.; BLUMENTHAL, J. A.; HERMAN, S.; KHATRI, P.; DORAISWAMY, M.; MOORE, K.; CRAIGHEAD, W. E.; BALDEWICZ, T. T.; KRISHNAN, K. R. Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months. **Psychosom Med**, v. 62, n. 5, p. 633-8, Sep-Oct 2000.

BALU, D. T.; HOSHAW, B. A.; MALBERG, J. E.; ROSENZWEIG-LIPSON, S.; SCHECHTER, L. E.; LUCKI, I. Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. **Brain Res**, v. 1211, p. 37-43, May 23 2008.

BANTICK, R. A.; DE VRIES, M. H.; GRASBY, P. M. The effect of a 5-HT1A receptor agonist on striatal dopamine release. **Synapse**, v. 57, n. 2, p. 67-75, Aug 2005.

BEARD, E.; BRAISSANT, O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. **J Neurochem**, v. 115, n. 2, p. 297-313, Oct 2010.

BEASLY, C. M. S., M.E.; BOSOMWORTH, J.C.; WERNICKE, J.F., High-dose fluoxetine: efficacy and activating-sedating effects in agitated and retarded depression. **J Clin Psychopharmacol**, v. 11, p. 166-74, 1991.

BEMBEN, M. G.; LAMONT, H. S. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. **Sports Med**, v. 35, n. 2, p. 107-25, 2005.

BENZI, G. Is there a rationale for the use of creatine either as nutritional supplementation or drug administration in humans participating in a sport? **Pharmacol Res**, v. 41, n. 3, p. 255-64, Mar 2000.

BERCHTOLD, N. C.; KESSLAK, J. P.; PIKE, C. J.; ADLARD, P. A.; COTMAN, C. W. Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. **Eur J Neurosci**, v. 14, n. 12, p. 1992-2002, Dec 2001.

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

BLAZER, D. G. Mood disorders: epidemiology. In: SADOCK, B. J., SADOCK, V.A. (Ed.). **Comprehensive Textbook of Psychiatry**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p.1298 - 1308.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 94, n. 2, p. 147-60, 1988.

BRAISSANT, O.; HENRY, H. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: a review. **J Inherit Metab Dis**, v. 31, n. 2, p. 230-9, Apr 2008.

CAMACHO, T. C.; ROBERTS, R. E.; LAZARUS, N. B.; KAPLAN, G. A.; COHEN, R. D. Physical activity and depression: evidence from the Alameda County Study. **Am J Epidemiol**, v. 134, n. 2, p. 220-31, Jul 15 1991.

CAO, L.; JIAO, X.; ZUZGA, D. S.; LIU, Y.; FONG, D. M.; YOUNG, D.; DURING, M. J. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. **Nat Genet**, v. 36, n. 8, p. 827-35, Aug 2004.

CASSILHAS, R. C.; LEE, K. S.; FERNANDES, J.; OLIVEIRA, M. G.; TUFIK, S.; MEEUSEN, R.; DE MELLO, M. T. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. **Neuroscience**, v. 202, p. 309-17, Jan 27 2012.

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

CHAE, C. H.; LEE, H. C.; JUNG, S. L.; KIM, T. W.; KIM, J. H.; KIM, N. J.; KIM, H. T. Swimming exercise increases the level of nerve growth factor and stimulates neurogenesis in adult rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 212, p. 30-7, Jun 14 2012.

CHAOULOFF, F. Physical exercise and brain monoamines: a review. **Acta Physiol Scand**, v. 137, n. 1, p. 1-13, Sep 1989.

CHEN, B.; DOWLATSHAHI, D.; MACQUEEN, G. M.; WANG, J. F.; YOUNG, L. T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260-5, Aug 15 2001.

CHEN, H. I.; LIN, L. C.; YU, L.; LIU, Y. F.; KUO, Y. M.; HUANG, A. M.; CHUANG, J. I.; WU, F. S.; LIAO, P. C.; JEN, C. J. Treadmill exercise enhances passive avoidance learning in rats: the role of down-regulated serotonin system in the limbic system. **Neurobiol Learn Mem**, v. 89, n. 4, p. 489-96, May 2008.

CHEN, J. J.; MARSH, L. Depression in Parkinson's disease: identification and management. **Pharmacotherapy**, v. 33, n. 9, p. 972-83, Sep 2013.

CHEN, M. J.; IVY, A. S.; RUSSO-NEUSTADT, A. A. Nitric oxide synthesis is required for exercise-induced increases in hippocampal BDNF and phosphatidylinositol 3' kinase expression. **Brain Res Bull**, v. 68, n. 4, p. 257-68, Jan 15 2006.

CHEN, M. J.; RUSSO-NEUSTADT, A. A. Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 135, n. 1-2, p. 181-93, Apr 27 2005.

Running exercise- and antidepressant-induced increases in growth and survival-associated signaling molecules are IGF-dependent. **Growth Factors**, v. 25, n. 2, p. 118-31, Apr 2007.

CHENNAOUI, M.; GRIMALDI, B.; FILLION, M. P.; BONNIN, A.; DROGOU, C.; FILLION, G.; GUEZENNEC, C. Y. Effects of physical training on functional activity of 5-HT_{1B} receptors in rat central nervous system: role of 5-HT-moduline. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 361, n. 6, p. 600-4, Jun 2000.

CHRUSCH, M. J.; CHILIBECK, P. D.; CHAD, K. E.; DAVISON, K. S.; BURKE, D. G. Creatine supplementation combined with resistance training in older men. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 12, p. 2111-7, Dec 2001.

CORDIOLI, A. V. Principais efeitos colaterais das drogas antiobsessivas e seu manejo. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 23, n. 2, p. 58-61, 2001.

COX, G.; MUJICA, I.; TUMILTY, D.; BURKE, L. Acute creatine supplementation and performance during a field test simulating match play in elite female soccer players. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 12, n. 1, p. 33-46, Mar 2002.

CRYAN, J. F.; LUCKI, I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 295, n. 3, p. 1120-6, Dec 2000.

CUNHA, M. P.; MACHADO, D. G.; CAPRA, J. C.; JACINTO, J.; BETTIO, L. E.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 11, p. 1489-501, Nov 2012.

CUNHA, M. P.; MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D.; ROMERO, A.; PARADA, E.; EGEA, J.; DEL BARRIO, L.; RODRIGUES, A. L.; LOPEZ, M. G. Protective effect of creatine against 6-hydroxydopamine-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Involvement of intracellular signaling pathways. **Neuroscience**, v. 238, p. 185-94, May 15 2013a.

CUNHA, M. P.; OLIVEIRA, A.; PAZINI, F. L.; MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E.; BUDNI, J.; AGUIAR, A. S., JR.; MARTINS, D. F.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. The antidepressant-like effect of physical activity on a voluntary running wheel. **Med Sci Sports Exerc**, v. 45, n. 5, p. 851-9, May 2013b.

CUNHA, M. P.; PAZINI, F. L.; OLIVEIRA, A.; BETTIO, L. E.; ROSA, J. M.; MACHADO, D. G.; RODRIGUES, A. L. The activation of alpha1-adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in

the tail suspension test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 44, p. 39-50, Jul 2013c.

CUNHA, M. P.; PAZINI, F. L.; OLIVEIRA, A.; MACHADO, D. G.; RODRIGUES, A. L. Evidence for the involvement of 5-HT1A receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. **Brain Res Bull**, v. 95, p. 61-9, Jun 2013d.

DELDICQUE, L.; THEISEN, D.; BERTRAND, L.; HESPEL, P.; HUE, L.; FRANCAUX, M. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 293, n. 4, p. C1263-71, Oct 2007.

DELGADO, P. L. Depression: the case for a monoamine deficiency. **J Clin Psychiatry**, v. 61 Suppl 6, p. 7-11, 2000.

DEUPREE, J. D.; REED, A. L.; BYLUND, D. B. Differential effects of the tricyclic antidepressant desipramine on the density of adrenergic receptors in juvenile and adult rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 321, n. 2, p. 770-6, May 2007.

DIAZ-MATAIX, L.; SCORZA, M. C.; BORTOLOZZI, A.; TOTH, M.; CELADA, P.; ARTIGAS, F. Involvement of 5-HT1A receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. **J Neurosci**, v. 25, n. 47, p. 10831-43, Nov 23 2005.

DIMEO, F.; BAUER, M.; VARAHRAM, I.; PROEST, G.; HALTER, U. Benefits from aerobic exercise in patients with major depression: a pilot study. **Br J Sports Med**, v. 35, n. 2, p. 114-7, Apr 2001.

DING, Q.; VAYNMAN, S.; AKHAVAN, M.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. **Neuroscience**, v. 140, n. 3, p. 823-33, Jul 7 2006.

DISHMAN, R. K.; BERTHOUD, H. R.; BOOTH, F. W.; COTMAN, C. W.; EDGERTON, V. R.; FLESHNER, M. R.; GANDEVIA, S. C.; GOMEZ-PINILLA, F.; GREENWOOD, B. N.; HILLMAN, C. H.; KRAMER, A. F.; LEVIN, B. E.; MORAN, T. H.; RUSSO-NEUSTADT, A. A.; SALAMONE, J. D.; VAN HOOMISSEN, J. D.; WADE, C. E.; YORK, D. A.; ZIGMOND, M. J. Neurobiology of exercise. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 3, p. 345-56, Mar 2006.

DONO, R.; TEXIDO, G.; DUSSEL, R.; EHMKE, H.; ZELLER, R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. **EMBO J**, v. 17, n. 15, p. 4213-25, Aug 3 1998.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1136-43, Jun 15 2006.

DUMAN, C. H.; SCHLESINGER, L.; RUSSELL, D. S.; DUMAN, R. S. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain Res**, v. 1199, p. 148-58, Mar 14 2008.

DUMAN, R. S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromolecular Med**, v. 5, n. 1, p. 11-25, 2004.

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

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-27, Jun 15 2006.

DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H. S.; ROBERTS, R. C.; CONLEY, R. C.; TAMMINGA, C. A.; PANDEY, G. N. Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 916-28, May 2001.

EBRAHIMI, S.; RASHIDY-POUR, A.; VAFAEI, A. A.; AKHAVAN, M. M. Central beta-adrenergic receptors play an important role in the enhancing effect of voluntary exercise on learning and memory in rat. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 189-93, Mar 17 2010.

ENGEL, D.; ZOMKOWSKI, A. D.; LIEBERKNECHT, V.; RODRIGUES, A. L.; GABILAN, N. H. Chronic administration of duloxetine and mirtazapine downregulates proapoptotic proteins and upregulates neurotrophin gene expression in the hippocampus and cerebral cortex of mice. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 6, p. 802-8, Jun 2013.

ENGESSER-CESAR, C.; ANDERSON, A. J.; COTMAN, C. W. Wheel running and fluoxetine antidepressant treatment have differential effects in the hippocampus and the spinal cord. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 1033-44, Feb 9 2007.

EVANS, S. J.; CHOUDARY, P. V.; NEAL, C. R.; LI, J. Z.; VAWTER, M. P.; TOMITA, H.; LOPEZ, J. F.; THOMPSON, R. C.; MENG, F.; STEAD, J. D.; WALSH, D. M.; MYERS, R. M.; BUNNEY, W. E.; WATSON, S. J.; JONES, E. G.; AKIL, H. Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 43, p. 15506-11, Oct 26 2004.

FABEL, K.; FABEL, K.; TAM, B.; KAUFER, D.; BAIKER, A.; SIMMONS, N.; KUO, C. J.; PALMER, T. D. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 2803-12, Nov 2003.

FOURNIER, N. M.; DUMAN, R. S. Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression. **Behav Brain Res**, v. 227, n. 2, p. 440-9, Feb 14 2012.

FREITAS, A. E.; MACHADO, D. G.; BUDNI, J.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; LOPES, M. W.; DE SOUZA, L. F.; DAFRE, A. L.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. **Behav Brain Res**, v. 237, p. 176-84, Jan 15 2013.

GAUGHRAN, F.; PAYNE, J.; SEDGWICK, P. M.; COTTER, D.; BERRY, M. Hippocampal FGF-2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder. **Brain Res Bull**, v. 70, n. 3, p. 221-7, Jul 31 2006.

GERECKE, K. M.; JIAO, Y.; PAGALA, V.; SMEYNE, R. J. Exercise does not protect against MPTP-induced neurotoxicity in BDNF haploinsufficient mice. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43250, 2012.

GOMEZ-PINILLA, F.; DAO, L.; SO, V. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. **Brain Res**, v. 764, n. 1-2, p. 1-8, Aug 1 1997.

GOMEZ-PINILLA, F.; SO, V.; KESSLAK, J. P. Spatial learning and physical activity contribute to the induction of fibroblast growth factor: neural substrates for increased cognition associated with exercise. **Neuroscience**, v. 85, n. 1, p. 53-61, Jul 1998.

GROENEVELD, G. J.; VELDINK, J. H.; VAN DER TWEEL, I.; KALMIJN, S.; BEIJER, C.; DE VISSER, M.; WOKKE, J. H.; FRANSSEN, H.; VAN DEN BERG, L. H. A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**, v. 53, n. 4, p. 437-45, Apr 2003.

GUALANO, B.; UGRINOWITSCH, C.; NOVAES, R. B.; ARTIOLI, G. G.; SHIMIZU, M. H.; SEGURO, A. C.; HARRIS, R. C.; LANCHI, A. H., JR. Effects of creatine supplementation on renal function: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Eur J Appl Physiol**, v. 103, n. 1, p. 33-40, May 2008.

GUMUSLU, E.; MUTLU, O.; SUNNETCI, D.; ULAK, G.; CELIKYURT, I. K.; CINE, N.; AKAR, F. The Effects of Tianeptine, Olanzapine and Fluoxetine on

the Cognitive Behaviors of Unpredictable Chronic Mild Stress-exposed Mice. **Drug Res (Stuttg)**, v. 63, n. 10, p. 532-9, Oct 2013.

GUO, Y.; FENG, P. OX2R activation induces PKC-mediated ERK and CREB phosphorylation. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 16, p. 2004-13, Oct 1 2012.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **J Comp Psychol**, v. 22, p. 345 - 352, 1936.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 45, p. 54-63, Aug 1 2013.

HEINE, V. M.; ZARENO, J.; MASLAM, S.; JOELS, M.; LUCASSEN, P. J. Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression. **Eur J Neurosci**, v. 21, n. 5, p. 1304-14, Mar 2005.

HENSLER, J. G. Differential regulation of 5-HT1A receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 5, p. 565-73, May 2002.

HODES, G. E.; HILL-SMITH, T. E.; LUCKI, I. Fluoxetine treatment induces dose dependent alterations in depression associated behavior and neural plasticity in female mice. **Neurosci Lett**, v. 484, n. 1, p. 12-6, Oct 22 2010.

HODES, G. E.; HILL-SMITH, T. E.; SUCKOW, R. F.; COOPER, T. B.; LUCKI, I. Sex-specific effects of chronic fluoxetine treatment on neuroplasticity and pharmacokinetics in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 332, n. 1, p. 266-73, Jan 2010.

HOLSBOER, F.; BARDEN, N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. **Endocr Rev**, v. 17, n. 2, p. 187-205, Apr 1996.

HUNSBERGER, J. G.; NEWTON, S. S.; BENNETT, A. H.; DUMAN, C. H.; RUSSELL, D. S.; SALTON, S. R.; DUMAN, R. S. Antidepressant actions of the exercise-regulated gene VGF. **Nat Med**, v. 13, n. 12, p. 1476-82, Dec 2007.

IVY, A. S.; RODRIGUEZ, F. G.; GARCIA, C.; CHEN, M. J.; RUSSO-NEUSTADT, A. A. Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, n. 1, p. 81-8, Apr 2003.

JAROSIK, J.; LEGUTKO, B.; WERNER, S.; UNSICKER, K.; VON BOHLEN UND HALBACH, O. Roles of exogenous and endogenous FGF-2 in animal

models of depression. **Restor Neurol Neurosci**, v. 29, n. 3, p. 153-65, 2011.

JIN, K.; ZHU, Y.; SUN, Y.; MAO, X. O.; XIE, L.; GREENBERG, D. A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 18, p. 11946-50, Sep 3 2002.

JIN, K. L.; MAO, X. O.; GREENBERG, D. A. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 18, p. 10242-7, Aug 29 2000.

JINDAL, A.; MAHESH, R.; BHATT, S. Etazolate rescues behavioral deficits in chronic unpredictable mild stress model: Modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and brain-derived neurotrophic factor level. **Neurochem Int**, v. 63, n. 5, p. 465-75, Nov 2013.

JUHN, M. S.; O'KANE, J. W.; VINCI, D. M. Oral creatine supplementation in male collegiate athletes: a survey of dosing habits and side effects. **J Am Diet Assoc**, v. 99, n. 5, p. 593-5, May 1999.

KALDIS, P.; HEMMER, W.; ZANOLLA, E.; HOLTZMAN, D.; WALLIMANN, T. 'Hot spots' of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus. **Dev Neurosci**, v. 18, n. 5-6, p. 542-54, 1996.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K. R.; RUSH, A. J.; WALTERS, E. E.; WANG, P. S.; NATIONAL COMORBIDITY SURVEY, R. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095-105, Jun 18 2003.

KIM, B. W.; CHOI, M.; KIM, Y. S.; PARK, H.; LEE, H. R.; YUN, C. O.; KIM, E. J.; CHOI, J. S.; KIM, S.; RHIM, H.; KAANG, B. K.; SON, H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. **Cell Signal**, v. 20, n. 4, p. 714-25, Apr 2008.

KIUCHI, T.; LEE, H.; MIKAMI, T. Regular exercise cures depression-like behavior via VEGF-Flk-1 signaling in chronically stressed mice. **Neuroscience**, v. 207, p. 208-17, Apr 5 2012.

LARSEN, M. H.; HAY-SCHMIDT, A.; RONN, L. C.; MIKKELSEN, J. D. Temporal expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the rat hippocampus after treatment with selective and mixed

monoaminergic antidepressants. **Eur J Pharmacol**, v. 578, n. 2-3, p. 114-22, Jan 14 2008.

LESEMANN, A.; REINEL, C.; HUHNCHEN, P.; PILHATSCH, M.; HELLWEG, R.; KLAISSE, P.; WINTER, C.; STEINER, B. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. **Brain Res**, v. 1457, p. 51-69, May 31 2012.

LETT, H. S.; BLUMENTHAL, J. A.; BABYAK, M. A.; SHERWOOD, A.; STRAUMAN, T.; ROBINS, C.; NEWMAN, M. F. Depression as a risk factor for coronary artery disease: evidence, mechanisms, and treatment. **Psychosom Med**, v. 66, n. 3, p. 305-15, May-Jun 2004.

LIN, T. W.; KUO, Y. M. Exercise Benefits Brain Function: The Monoamine Connection. **Brain Sciences**, v. 3, n. 1, p. 39 - 56, 2013.

LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 8, p. 603-14, Aug 2005.

MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A.; GRANDO, J.; BROCARD, P. S.; BETTIO, L. E.; CAPRA, J. C.; RODRIGUES, A. L. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 220-9, Dec 2012a.

MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A. R.; GRANDO, J.; BROCARD, P. S.; BETTIO, L. E.; DALMARCO, J. B.; RIAL, D.; PREDIGER, R. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. Rosmarinus officinalis L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 1, p. 158-69, Aug 30 2012b.

MACRAE, P. G.; SPIRDUSO, W. W.; CARTEE, G. D.; FARRAR, R. P.; WILCOX, R. E. Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolite levels. **Neurosci Lett**, v. 79, n. 1-2, p. 138-44, Aug 18 1987.

MALLEI, A.; SHI, B.; MOCCHETTI, I. Antidepressant treatments induce the expression of basic fibroblast growth factor in cortical and hippocampal neurons. **Mol Pharmacol**, v. 61, n. 5, p. 1017-24, May 2002.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. **Nat Med**, v. 7, n. 5, p. 541-7, May 2001.

MANN, J. J.; MALONE, K. M.; SWEENEY, J. A.; BROWN, R. P.; LINNOILA, M.; STANLEY, B.; STANLEY, M. Attempted suicide characteristics and cerebrospinal fluid amine metabolites in depressed inpatients. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 6, p. 576-86, Dec 1996.

MARAGNOLI, M. E.; FUMAGALLI, F.; GENNARELLI, M.; RACAGNI, G.; RIVA, M. A. Fluoxetine and olanzapine have synergistic effects in the modulation of fibroblast growth factor 2 expression within the rat brain. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 11, p. 1095-102, Jun 1 2004.

MATHER, A. S.; RODRIGUEZ, C.; GUTHRIE, M. F.; MCHARG, A. M.; REID, I. C.; MCMURDO, M. E. Effects of exercise on depressive symptoms in older adults with poorly responsive depressive disorder: randomised controlled trial. **Br J Psychiatry**, v. 180, p. 411-5, May 2002.

MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci**, v. 27, n. 10, p. 589-94, Oct 2004.

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

MCMORRIS, T.; HARRIS, R. C.; HOWARD, A. N.; LANGRIDGE, G.; HALL, B.; CORBETT, J.; DICKS, M.; HODGSON, C. Creatine supplementation, sleep deprivation, cortisol, melatonin and behavior. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 21-8, Jan 30 2007.

MCMORRIS, T.; HARRIS, R. C.; SWAIN, J.; CORBETT, J.; COLLARD, K.; DYSON, R. J.; DYE, L.; HODGSON, C.; DRAPER, N. Effect of creatine supplementation and sleep deprivation, with mild exercise, on cognitive and psychomotor performance, mood state, and plasma concentrations of catecholamines and cortisol. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 185, n. 1, p. 93-103, Mar 2006.

MEEUSEN, R.; DE MEIRLEIR, K. Exercise and brain neurotransmission. **Sports Med**, v. 20, n. 3, p. 160-88, Sep 1995.

MIDDLEMISS, D. N.; PRICE, G. W.; WATSON, J. M. Serotonergic targets in depression. **Curr Opin Pharmacol**, v. 2, n. 1, p. 18-22, Feb 2002.

MOLTENI, R.; CALABRESE, F.; BEDOGNI, F.; TONGIORGI, E.; FUMAGALLI, F.; RACAGNI, G.; RIVA, M. A. Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 3, p. 307-17, Jun 2006.

MONTGOMERY, S. A.; HENRY, J.; MCDONALD, G.; DINAN, T.; LADER, M.; HINDMARCH, I.; CLARE, A.; NUTT, D. Selective serotonin reuptake inhibitors: meta-analysis of discontinuation rates. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 9, n. 1, p. 47-53, Spring 1994.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; DOS SANTOS, D. B.; ANTUNES, A.; DAUFENBACH, J. F.; MANOSSO, L. M.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **J Mol Neurosci**, v. 49, n. 1, p. 68-79, Jan 2013.

MOTA-PEREIRA, J.; SILVERIO, J.; CARVALHO, S.; RIBEIRO, J. C.; FONTE, D.; RAMOS, J. Moderate exercise improves depression parameters in treatment-resistant patients with major depressive disorder. **J Psychiatr Res**, v. 45, n. 8, p. 1005-11, Aug 2011.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9063, p. 1436-42, May 17 1997.

MUSAZZI, L.; CATTANEO, A.; TARDITO, D.; BARBON, A.; GENNARELLI, M.; BARLATI, S.; RACAGNI, G.; POPOLI, M. Early raise of BDNF in hippocampus suggests induction of posttranscriptional mechanisms by antidepressants. **BMC Neurosci**, v. 10, p. 48, 2009.

MUSSELMAN, D. L.; EVANS, D. L.; NEMEROFF, C. B. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. **Arch Gen Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 580-92, Jul 1998.

NAIR, A.; VAIDYA, V. A. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? **J Biosci**, v. 31, n. 3, p. 423-34, Sep 2006.

NEEPER, S. A.; GOMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. W. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res**, v. 726, n. 1-2, p. 49-56, Jul 8 1996.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1068-70, Nov 2002.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, Mar 28 2002a.

NESTLER, E. J.; GOULD, E.; MANJI, H.; BUNCAN, M.; DUMAN, R. S.; GRESHENFELD, H. K.; HEN, R.; KOESTER, S.; LEDERHENDLER, I.; MEANEY, M.; ROBBINS, T.; WINSKY, L.; ZALCMAN, S. Preclinical models:

status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 503-28, Sep 15 2002b.

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

PALMER, T. D.; WILLHOITE, A. R.; GAGE, F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **J Comp Neurol**, v. 425, n. 4, p. 479-94, Oct 2 2000.

PARK, S. E.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W.; MCCUSKER, R. H. Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 12, 2011.

PERERA, T. D.; COPLAN, J. D.; LISANBY, S. H.; LIPIRA, C. M.; ARIF, M.; CARPIO, C.; SPITZER, G.; SANTARELLI, L.; SCHARF, B.; HEN, R.; ROSOKLIJA, G.; SACKEIM, H. A.; DWORK, A. J. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. **J Neurosci**, v. 27, n. 18, p. 4894-901, May 2 2007.

PERSKY, A. M.; BRAZEAU, G. A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 161-76, Jun 2001.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 177, n. 3, p. 245-55, Jan 2005.

PILU, A.; SORBA, M.; HARDOY, M. C.; FLORIS, A. L.; MANNU, F.; SERUIS, M. L.; VELLUTI, C.; CARPINIELLO, B.; SALVI, M.; CARTA, M. G. Efficacy of physical activity in the adjunctive treatment of major depressive disorders: preliminary results. **Clin Pract Epidemiol Ment Health**, v. 3, p. 8, 2007.

PINCUS, H. A.; PETTIT, A. R. The societal costs of chronic major depression. **J Clin Psychiatry**, v. 62 Suppl 6, p. 5-9, 2001.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88-109, Jan 2008.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, Oct 1977.

PULCINELLI, A. J.; BARROS, J. F. O efeito antidepressivo do exercício físico em indivíduos com transtornos mentais. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 18, n. 2, p. 116-120, 2010.

RAE, C.; DIGNEY, A. L.; MCEWAN, S. R.; BATES, T. C. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Proc Biol Sci**, v. 270, n. 1529, p. 2147-50, Oct 22 2003.

RAI, K. S.; HATTIANGADY, B.; SHETTY, A. K. Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 7, p. 1765-79, Oct 2007.

RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F.; LIMA, F. D.; SOUZA, M. A.; SILVA, L. F.; RETAMOSO, L. T.; CORTE, C. L.; PUNTEL, G. O.; DE AVILA, D. S.; SOARES, F. A.; FIGHERA, M. R.; MELLO, C. F.; ROYES, L. F. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. **Neurochem Int**, v. 55, n. 5, p. 333-40, Sep 2009.

RAWSON, E. S.; LIEBERMAN, H. R.; WALSH, T. M.; ZUBER, S. M.; HARHART, J. M.; MATTHEWS, T. C. Creatine supplementation does not improve cognitive function in young adults. **Physiol Behav**, v. 95, n. 1-2, p. 130-4, Sep 3 2008.

REHAVI, M.; RAMOT, O.; YAVETZ, B.; SOKOLOVSKY, M. Amitriptyline: long-term treatment elevates alpha-adrenergic and muscarinic receptor binding in mouse brain. **Brain Res**, v. 194, n. 2, p. 443-53, Aug 4 1980.

REUS, G. Z.; ABELAIRA, H. M.; AGOSTINHO, F. R.; RIBEIRO, K. F.; VITTO, M. F.; LUCIANO, T. F.; SOUZA, C. T.; QUEVEDO, J. The administration of olanzapine and fluoxetine has synergistic effects on intracellular survival pathways in the rat brain. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 8, p. 1029-35, Aug 2012.

ROSENSTEIN, J. M.; KRUM, J. M. New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. **Exp Neurol**, v. 187, n. 2, p. 246-53, Jun 2004.

RUHE, H. G.; MASON, N. S.; SCHENE, A. H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 4, p. 331-59, Apr 2007.

RUMP, L. C.; MAJEWSKI, H. Modulation of norepinephrine release through alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in rat isolated kidney. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 9, n. 4, p. 500-7, Apr 1987.

RUSSO-NEUSTADT, A.; BEARD, R. C.; COTMAN, C. W. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 5, p. 679-82, Nov 1999.

RUSSO-NEUSTADT, A.; HA, T.; RAMIREZ, R.; KESSLAK, J. P. Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. **Behav Brain Res**, v. 120, n. 1, p. 87-95, Apr 8 2001.

RUSSO-NEUSTADT, A. A.; BEARD, R. C.; HUANG, Y. M.; COTMAN, C. W. Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 101, n. 2, p. 305-12, 2000.

SARBADHIKARI, S. N.; SAHA, A. K. Moderate exercise and chronic stress produce counteractive effects on different areas of the brain by acting through various neurotransmitter receptor subtypes: a hypothesis. **Theor Biol Med Model**, v. 3, p. 33, 2006.

SCHILDKRAUT, J. J. Biogenic amines and affective disorders. **Annu Rev Med**, v. 25, n. 0, p. 333-48, 1974.

SCHRATZBERGER, P.; SCHRATZBERGER, G.; SILVER, M.; CURRY, C.; KEARNEY, M.; MAGNER, M.; ALROY, J.; ADELMAN, L. S.; WEINBERG, D. H.; ROPPER, A. H.; ISNER, J. M. Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. **Nat Med**, v. 6, n. 4, p. 405-13, Apr 2000.

SHI, C. G.; WANG, L. M.; WU, Y.; WANG, P.; GAN, Z. J.; LIN, K.; JIANG, L. X.; XU, Z. Q.; FAN, M. Intranasal administration of nerve growth factor produces antidepressant-like effects in animals. **Neurochem Res**, v. 35, n. 9, p. 1302-14, Sep 2010.

SILVERMAN, W. F.; KRUM, J. M.; MANI, N.; ROSENSTEIN, J. M. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. **Neuroscience**, v. 90, n. 4, p. 1529-41, 1999.

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

SNOW, R. J.; MCKENNA, M. J.; SELIG, S. E.; KEMP, J.; STATHIS, C. G.; ZHAO, S. Effect of creatine supplementation on sprint exercise performance and muscle metabolism. **J Appl Physiol (1985)**, v. 84, n. 5, p. 1667-73, May 1998.

SNOW, R. J.; MURPHY, R. M. Creatine and the creatine transporter: a review. **Mol Cell Biochem**, v. 224, n. 1-2, p. 169-81, Aug 2001.

SONDELL, M.; LUNDBORG, G.; KANJE, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. **J Neurosci**, v. 19, n. 14, p. 5731-40, Jul 15 1999.

SONDELL, M.; SUNDLER, F.; KANJE, M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 12, p. 4243-54, Dec 2000.

SUTOO, D.; AKIYAMA, K. Regulation of brain function by exercise. **Neurobiol Dis**, v. 13, n. 1, p. 1-14, Jun 2003.

SZEGEDI, V.; JUHASZ, G.; ZHANG, X.; BARKOCZI, B.; QI, H.; MADEIRA, A.; KAPUS, G.; SVENNINGSSON, P.; SPEDDING, M.; PENKE, B. Tianeptide potentiates AMPA receptors by activating CaMKII and PKA via the p38, p42/44 MAPK and JNK pathways. **Neurochem Int**, v. 59, n. 8, p. 1109-22, Dec 2011.

TANG, K.; XIA, F. C.; WAGNER, P. D.; BREEN, E. C. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 170, n. 1, p. 16-22, Jan 31 2010.

TAO, Y.; BLACK, I. B.; DICICCO-BLOOM, E. Neurogenesis in neonatal rat brain is regulated by peripheral injection of basic fibroblast growth factor (bFGF). **J Comp Neurol**, v. 376, n. 4, p. 653-63, Dec 23 1996.

TARNOPOLSKY, M. A. Potential benefits of creatine monohydrate supplementation in the elderly. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 3, n. 6, p. 497-502, Nov 2000.

TERI, L.; GIBBONS, L. E.; MCCURRY, S. M.; LOGSDON, R. G.; BUCHNER, D. M.; BARLOW, W. E.; KUKULL, W. A.; LACROIX, A. Z.; MCCORMICK, W.; LARSON, E. B. Exercise plus behavioral management in patients with Alzheimer disease: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 290, n. 15, p. 2015-22, Oct 15 2003.

TIERNEY, J. G. Treatment-resistant depression: managed care considerations. **J Manag Care Pharm**, v. 13, n. 6 Suppl A, p. S2-7, Jul 2007.

TRINDADE, E.; MENON, D.; TOPFER, L. A.; COLOMA, C. Adverse effects associated with selective serotonin reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants: a meta-analysis. **CMAJ**, v. 159, n. 10, p. 1245-52, Nov 17 1998.

TRIVEDI, M. H.; GREER, T. L.; GRANNEMANN, B. D.; CHAMBLISS, H. O.; JORDAN, A. N. Exercise as an augmentation strategy for treatment of major depression. **J Psychiatr Pract**, v. 12, n. 4, p. 205-13, Jul 2006.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. **Neuroscience**, v. 122, n. 3, p. 647-57, 2003.

The select action of hippocampal calcium calmodulin protein kinase II in mediating exercise-enhanced cognitive function. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 825-33, Feb 9 2007.

VERHEIJ, M. M.; COOLS, A. R. Mesolimbic alpha-, but not beta-adrenoceptors control the accumbal release of dopamine that is derived from reserpine-sensitive storage vesicles. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 1163-73, Sep 15 2009.

VIDEBECH, P.; RAVNKILDE, B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 11, p. 1957-66, Nov 2004.

VOSS, M. W.; ERICKSON, K. I.; PRAKASH, R. S.; CHADDOCK, L.; KIM, J. S.; ALVES, H.; SZABO, A.; PHILLIPS, S. M.; WOJCICKI, T. R.; MAILEY, E. L.; OLSON, E. A.; GOTHE, N.; VIEIRA-POTTER, V. J.; MARTIN, S. A.; PENCE, B. D.; COOK, M. D.; WOODS, J. A.; MCAULEY, E.; KRAMER, A. F. Neurobiological markers of exercise-related brain plasticity in older adults. **Brain Behav Immun**, v. 28, p. 90-9, Feb 2013.

WALKER, J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 50, p. 177-242, 1979.

WANG, Z.; HU, S. Y.; LEI, D. L.; SONG, W. X. [Effect of chronic stress on PKA and P-CREB expression in hippocampus of rats and the antagonism of antidepressors]. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 31, n. 5, p. 767-71, Oct 2006.

WARNER-SCHMIDT, J. L.; DUMAN, R. S. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 11, p. 4647-52, Mar 13 2007.

WATANABE, A.; KATO, N.; KATO, T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. **Neurosci Res**, v. 42, n. 4, p. 279-85, Apr 2002.

WENTHUR, C. J.; BENNETT, M. R.; LINDSLEY, C. W. Classics in Chemical Neuroscience: Fluoxetine (Prozac). **ACS Chem Neurosci**, Nov 15 2013.

WERNER, S.; UNSICKER, K.; VON BOHLEN UND HALBACH, O. Fibroblast growth factor-2 deficiency causes defects in adult hippocampal neurogenesis, which are not rescued by exogenous fibroblast growth factor-2. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 10, p. 1605-17, Oct 2011.

WILLIAMS, M. H.; BRANCH, J. D. Creatine supplementation and exercise performance: an update. **J Am Coll Nutr**, v. 17, n. 3, p. 216-34, Jun 1998.

WILLIS, J.; JONES, R.; NWOKOLO, N.; LEVY, J. Protein and creatine supplements and misdiagnosis of kidney disease. **BMJ**, v. 340, p. b5027, 2010.

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

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1107-213, Jul 2000.

YI, L. T.; LI, J.; GENG, D.; LIU, B. B.; FU, Y.; TU, J. Q.; LIU, Y.; WENG, L. J. Essential oil of *Perilla frutescens*-induced change in hippocampal expression of brain-derived neurotrophic factor in chronic unpredictable mild stress in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 147, n. 1, p. 245-53, May 2 2013.

YOUNG, A. H. Review: lithium reduces the risk of suicide compared with placebo in people with depression and bipolar disorder. **Evid Based Ment Health**, Sep 17 2013.

ZHANG, Y.; GU, F.; CHEN, J.; DONG, W. Chronic antidepressant administration alleviates frontal and hippocampal BDNF deficits in CUMS rat. **Brain Res**, v. 1366, p. 141-8, Dec 17 2010.

ZHONG, P.; WANG, W.; YU, F.; NAZARI, M.; LIU, X.; LIU, Q. S. Phosphodiesterase 4 inhibition impairs cocaine-induced inhibitory synaptic plasticity and conditioned place preference. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 11, p. 2377-87, Oct 2012.

ZOU, C.; DING, X.; FLAHERTY, J. H.; DONG, B. Clinical efficacy and safety of fluoxetine in generalized anxiety disorder in Chinese patients. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 9, p. 1661-1670, 2013.