

Luis Eduardo Beltrão Bettio

EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA EM
DIFERENTES MODELOS ANIMAIS

Tese submetida ao Programa de
Pós-graduação em Neurociências
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de Doutor em Neurociências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia
Severo Rodrigues

Florianópolis
2016

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

Bettio, Luis Eduardo Beltrão

Efeito tipo-antidepressivo da guanosina em diferentes
modelos animais / Luis Eduardo Beltrão Bettio ;
orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues - Florianópolis,
SC, 2016.

178 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Guanosina. 3. Depressão. 4.
Antidepressivos. 5. Purinas. I. Rodrigues, Ana Lúcia
Severo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

LUIS EDUARDO BELTRÃO BETTIO

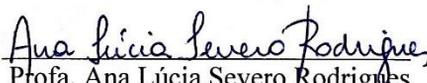
**“EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA
EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS”**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

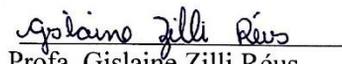
Florianópolis, 29 de fevereiro de 2016.

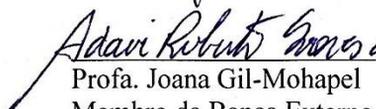

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Orientadora – UFSC


Prof. Carla Inês Tasca
Membro - UFSC


Prof. Gislainé Zilli Réus
Membro da Banca Externo


Prof. Joana Gil-Mohapel
Membro da Banca Externo
(videoconferência)


Prof. Manuella Pinto Kaster
Membro - UFSC


Prof. Morgana Moretti
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

É sempre complexo agradecer a todos que tiveram um papel relevante durante os anos que seguiram desde o ingresso no doutorado pois tanta coisa acontece nesse tempo que, por mais que nos esforcemos, sempre pode ficar alguém de fora que merecia ter sido mencionado. Mas vou tentar ser o mais justo possível com quem teve um papel importante para o desenrolar desta tese. Queria agradecer em especial:

À minha família por todo suporte e apoio mútuo durante tempos turbulentos que surgiram no transcorrer da tese e por, mesmo diante de uma grande perda, não se render ao desânimo absoluto e seguir em frente. Entre tantos momentos que meu pai faz falta, certamente os de conquista de algum objetivo estão entre aqueles em que essa se faz mais presente (afinal comemorações eram seu forte).

À minha orientadora Ana Lúcia Rodrigues por ter me aceitado no laboratório ainda durante a graduação, assim como pela participação e incentivo durante minha formação científica.

A todos os alunos do Laboratório de Neurobiologia da Depressão, principalmente aqueles que foram mais próximos durante minha tese. Em especial para Vivis, Pri, Camys e Morgs (por terem sido uma espécie de pilar nesse trabalho, tanto ajudando nos experimentos quanto pelos momentos de descontração fora do laboratório). Também à Ágatha (por todas as festas e momentos que marcaram), Colla, Gisa e Pammys (pelas cervejas pós-lab), Luana, Júlia e Manu (pelas conversas e fugas para esfriar a cabeça no meio da tarde), Andiara (pelas parcerias dentro e fora do lab) e a todos os demais alunos e agregados do laboratório (Dai e Day, Vitor, Aline, Fernanda, Francis, Ana Ramos, Nicolle e Mauren). Queria agradecer ainda aos alunos de laboratórios vizinhos que contribuíram para alguns experimentos, em especial à Danúbia e ao Filipe.

Quanto ao ano canadense que tive no decorrer da tese, queria muito agradecer a todos os alunos e agregados do Christie Lab: à Pati (por ter me incentivado e ajudado a ir fazer pesquisa tão longe), Joana e Anna Patten (por tudo que me ensinaram, suporte, *feedback* e amizade), Brian (por ter me acolhido no laboratório de braços abertos e expandido minha visão de pesquisa), Christine, Alicia, Scott, Sonata, Mohamed e Ryan (por todos os socorros no lab e cervejas fora dele), a todos os *undergrads* que me ajudaram a me adaptar, em especial Jason, Chris, Fran, Matt, Zoe, Josh, Aaron, Karthik e Arian (além de toda a descontração dentro e fora do lab). Queria agradecer também à família Spark por ter feito eu me sentir tão acolhido quando tudo parecia tão estranho para mim, acho que não poderia ter encontrado *roommates* melhores. E a todas os brasileiros que estavam

perdidos por Victoria também e se juntaram para explorar as redondezas e almoçar juntos todos os dias na Universidade (quando desisti de convencer canadense que almoço existe).

Aos meus amigos que nada tem a ver com pesquisa, mas que são parcerias indispensáveis há tantos anos nas horas de sair e descontrair: Zucco, Mari, Panthera, Rade (pois que às vezes dá para mensurar o nível de consideração pelo quanto as pessoas se xingam) e Christiano (que infelizmente teve que partir durante essa tese também).

Não posso deixar de agradecer também a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências por tudo que me ensinaram durante as disciplinas, assim como a todos os alunos pelo convívio e amizade. E, obviamente, ao Nivaldo, por ser sempre tão paciente e tranquilo em resolver todos os pepinos que aparecem.

Por fim, agradeço aos animais aqui de casa, em especial o Bonnie, pela companhia silenciosa em tempo integral e demonstração não-verbal de afeto constante.

À CAPES pelo apoio financeiro e a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta etapa mas acabei não mencionando.

“- You talk about redefining my identity. I want a guarantee that I can still be myself.

- There isn't one. Why would you wish to? All things change in a dynamic environment. Your effort to remain what you are is what limits you.”

Ghost in the Shell

RESUMO

A guanosina é um nucleosídeo purinérgico liberado extracelularmente no encéfalo após situações de insulto, agindo como agente neuroprotetor endógeno capaz de desencadear efeitos neurotróficos, assim como reduzir a excitotoxicidade, o estresse oxidativo e neuroinflamação. Em estudo prévio foi demonstrado que esse nucleosídeo apresenta propriedade tipo-antidepressiva em modelos animais preditivos. Uma vez que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia da depressão, um dos objetivos deste estudo foi investigar a associação entre o efeito tipo-antidepressivo da guanosina e a modulação de parâmetros oxidantes/antioxidantes no hipocampo de camundongos Swiss. Os animais foram submetidos ao estresse de contenção (EC) agudo, um protocolo conhecido por induzir um comportamento tipo-depressivo associado com a ocorrência de estresse oxidativo no encéfalo. O pré-tratamento com guanosina (5 mg/kg, p.o.) foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo no teste do nado forçado (TNF) e o aumento nos níveis de malondialdeído induzido pelo EC. Além disso, embora nenhuma alteração tenha sido encontrada nos níveis hipocâmpais de glutathiona (GSH), o protocolo de EC causou um aumento na atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD), assim como uma redução na atividade da catalase (CAT) no hipocampo. O pré-tratamento com guanosina foi capaz de prevenir as alterações nas atividades da GPx, GR e CAT, mas potencializou o aumento na atividade da SOD induzido pelo EC. Adicionalmente, uma vez que antidepressivos convencionais exercem seus efeitos em associação com um aumento na neurogênese hipocâmpal, o presente estudo também investigou o efeito tipo-antidepressivo desse nucleosídeo após administração crônica (5 mg/kg/dia, p.o., 21 dias), assim como seus efeitos sobre a proliferação celular e diferenciação neuronal no hipocampo. O tratamento com guanosina ocasionou um efeito tipo-antidepressivo no teste de suspensão pela cauda (TSC), sem desencadear alterações significativas no número de células Ki-67- e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)-positivas no giro denteado (GD) hipocâmpal dos camundongos. Entretanto, um aumento significativo no número de neurônios imaturos foi observado na avaliação por imunohistoquímica para proteína fator de diferenciação (NeuroD). Curiosamente, esse efeito foi localizado no GD do hipocampo ventral, uma região conhecida por regular comportamentos emocionais e motivacionais. Por fim, o presente trabalho também realizou uma análise comparativa dos efeitos da guanosina com os de um antidepressivo convencional (fluoxetina) e um de ação rápida (cetamina)

em modelos de estresse crônico. Camundongos expostos ao estresse crônico imprevisível (ECI) e ao modelo de estresse induzido por corticosterona receberam uma dose única de guanosina (5 mg/kg/dia, p.o.), fluoxetina (10 mg/kg/dia, p.o.) ou cetamina (1 mg/kg/dia, i.p.), 24 h antes de serem submetidos ao TSC. Apenas a guanosina e a cetamina se mostraram capazes de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido por ambos os modelos de estresse crônico. Em conjunto, os resultados do presente estudo fornecem evidência de que a guanosina é capaz de reverter o comportamento tipo-depressivo induzido pela exposição a modelos de estresse agudo e de estresse crônico. Além disso, os dados encontrados também sugerem que a capacidade da guanosina de desecandear uma resposta neuroprotetora e efeitos tróficos possivelmente desempenha um papel importante na atividade antidepressiva desse nucleosídeo.

Palavras-chave: antidepressivo; antioxidante; depressão; guanosina; hipocampo; neurogênese

ABSTRACT

Guanosine is a purine nucleoside thought to have neuroprotective properties. It is released in the brain following injury, reducing excitotoxicity, oxidative stress and neuroinflammation, as well as exerting trophic effects. In a previous study, it was demonstrated that this endogenous nucleoside displays antidepressant-like properties in predictive animal models of depression. Taking into account the role of oxidative stress in modulating depressive disorders, one of the aims of this study was to investigate whether the antidepressant-like effect of guanosine is accompanied by a modulation of hippocampal oxidant/antioxidant parameters. Adult Swiss mice were submitted to an acute restraint stress (ARS) protocol, which is known to cause behavioral changes associated with neuronal oxidative damage. The pretreatment with guanosine (5 mg/kg, p.o.) prevented the occurrence of a depressive-like behavior in the forced swimming test (FST), as well as the significant increase in the levels of hippocampal malondialdehyde induced by ARS. Moreover, although no alteration was found in hippocampal levels of glutathione (GSH), the group submitted to ARS procedure presented an increase in glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD) activities, as well as a reduction in catalase (CAT) activity in the hippocampus. Guanosine was able to prevent stress-induced alterations in GPx, GR e CAT activities, but potentiated the increase in SOD activity elicited by ARS. Additionally, since conventional antidepressants exert their effects by increasing hippocampal neurogenesis, the present study also investigated the antidepressant-like properties of this nucleoside after chronic administration (5 mg/kg/day, p.o., 21 days) and its effects on cell proliferation and neuronal differentiation in the hippocampus. Guanosine treatment exerted an antidepressant-like effect in the tail suspension test (TST), without causing significant alterations in the numbers of Ki-67- and proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive cells in the hippocampal dentate gyrus (DG) of mice. However, guanosine treatment resulted in a significant increase in the number of immature neurons, as assessed by immunohistochemistry for the neurogenic differentiation protein (NeuroD). Interestingly, this effect was localized to the ventral hippocampal DG, a functionally distinct region of this structure known to regulate emotional and motivational behaviors. Finally, the present study also performed a comparative analysis of the antidepressant-like effect of guanosine with a conventional antidepressant (fluoxetine) and with a fast-acting drug (ketamine), using models of chronic stress. Mice exposed to chronic unpredictable stress (CUS) and to chronic corticosterone-induced

stress received a single dose of guanosine (5 mg/kg/dia, p.o.), fluoxetine (10 mg/kg/dia, p.o.) or ketamine (1 mg/kg/dia, i.p.), 24 h before being submitted to the TST. Only guanosine and ketamine were able to reverse the depressive-like behavior induced by both models of chronic stress. Altogether, the results of the present study provide evidence for the ability of this nucleoside to prevent depressive-like behavior in models of both acute and chronic stress. Furthermore, these findings also suggest that the neuroprotective and neurotrophic effects of this nucleoside possibly play an important role in its antidepressant-like activity.

Keywords: antidepressant; antioxidant; depression; guanosine; hippocampus; neurogenesis

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1. Estruturas corticais e límbicas implicadas no transtorno depressivo maior.....	33
Figura 2. Hipótese monoaminérgica da depressão	34
Figura 3. O ciclo glutamato-glutamina na sinapse	38
Figura 4. Efeitos do estresse sobre a sinapse glutamatérgica	42
Figura 5: Principais enzimas antioxidantes presentes nas células de mamíferos.....	46
Figura 6. Desenvolvimento de células-tronco em neurônios maduros na camada de células granulares do giro dentado hipocampal	51
Figura 7. Hipótese neurotrófica da depressão	53
Figura 8. Sinalização intracelular envolvida no efeito de antidepressivos monoaminérgicos	55
Figura 9. Vias de sinalização implicadas na resposta antidepressiva rápida	58
Figura 10. Famílias de receptores purinérgicos.....	62
Figura 11. Mecanismos envolvidos nos efeitos da guanosina.....	69

CAPÍTULO 1 – GUANOSINA PREVINE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E DANO OXIDATIVO INDUZIDOS PELO ESTRESSE DE CONTENÇÃO AGUDO

Figura 1. Cronograma dos procedimentos experimentais	79
Figura 2. Teste do nado forçado (TNF).....	80
Figura 3. Teste do campo aberto	81
Figura 4. Efeito do pré-tratamento com guanosina ou fluoxetina nas alterações comportamentais induzidas pelo EC no TNF e na atividade locomotora dos animais.....	85
Figura 5. Efeito do tratamento com guanosina na formação de TBARS no hipocampo de animais submetidos ao EC.....	86
Figura 6. Efeito do tratamento com guanosina nas atividades da SOD e CAT no hipocampo de camundongos submetidos ao EC	88
Figura 7. Efeito do tratamento com guanosina na razão SOD/CAT no hipocampo de camundongos submetidos ao EC	89
Figura 8. Efeito do tratamento com guanosina nos níveis de GSH hipocampal em animais submetidos ao EC	90
Figura 9. Efeito do EC e/ou tratamento com guanosina nas atividades da GPx e da GR no hipocampo	91
Figura 10. Diagrama esquemático com os resultados referentes ao Capítulo 1.....	96

CAPÍTULO 2 – O EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM GUANOSINA ESTÁ ASSOCIADO A UM AUMENTO NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Figura 1. Diagrama dos procedimentos experimentais	99
Figura 2. Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	100
Figura 3. Efeito do tratamento crônico com guanosina no TSC e no teste do campo aberto.....	104
Figura 4. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina no TSC e no teste do campo aberto.....	105
Figura 5. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina na proliferação celular avaliada por imunohistoquímica para Ki-67	106
Figura 6. Efeito do tratamento crônico com guanosina na proliferação celular avaliada por imunohistoquímica para Ki-67	107
Figura 7. Efeito do tratamento crônico com guanosina na proliferação celular avaliada por imunohistoquímica para PCNA.....	109
Figura 8. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina na diferenciação neuronal celular avaliada por imunohistoquímica para NeuroD.....	110
Figura 9. Efeito do tratamento crônico com guanosina na diferenciação neuronal celular avaliada por imunohistoquímica para NeuroD.....	112
Figura 10. Correlação estatística entre o tempo de imobilidade no TSC e resultados imunohistoquímicos.....	113
Figura 11. Diagrama esquemático com os resultados referentes ao Capítulo 2	118

CAPÍTULO 3 – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA, FLUOXETINA E CETAMINA EM MODELOS DE ESTRESSE CRÔNICO

Figura 1. Diagrama dos procedimentos experimentais	123
Figura 2. Efeito do tratamento agudo com guanosina, fluoxetina ou cetamina 24 h antes do TSC em camundongos submetidos ao protocolo de ECI.....	127
Figura 3. Efeito dos tratamentos com guanosina, fluoxetina ou cetamina em camundongos submetidos ao modelo de estresse induzido pela administração de corticosterona.....	128

4. CONCLUSÕES

Figura 1. Resumo dos resultados obtidos.....	132
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário dos sintomas para o diagnóstico clínico da depressão	30
--	----

CAPÍTULO 3 – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA, FLUOXETINA E CETAMINA EM MODELOS DE ESTRESSE CRÔNICO

Tabela 1. Cronograma dos agentes estressores utilizados no protocolo de estresse crônico imprevisível.....	124
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA – análise de variância
ATP – adenosina 5'-trifosfato
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE – barreira hematoencefálica
CA3 – *cornu ammonis* 3
CAT – catalase
CREB – elemento de resposta ao AMPc
DAB – 2,2-diaminobenzedina
DG – derivados da guanina
EAAT – transportador de aminoácidos excitatórios
EPM – erro padrão da média
ERO – espécie reativa de oxigênio
GC – glicocorticoide
GD – giro denteado
GPx – glutationa peroxidase
GR – glutationa redutase
GSH – glutationa reduzida
GSSG – glutationa oxidada
GDP – guanosina 5'-difosfato
GTP – guanosina 5'-trifosfato
HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal
ISRS – inibidor seletivo da recaptção de serotonina
LPS – lipopolissacarídeo
MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno
MDA – malondialdeído
mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NeuroD – proteína fator de diferenciação
NGF – fator de crescimento do nervo
NMDA – *N*-metil-D-aspartato
Nrf2 – fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
HO-1 – heme oxigenase-1
PBS – tampão fosfato-salina
PC12 – feocromocitoma
PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular
PI3K – fosfatidilinositol 3-fosfato cinase
PKA – proteína cinase A

PSD-95 – proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa

RG – receptor de glicocorticoide

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBS – solução salina tamponada com Tris

ZSG – zona subgranular

ZSV – zona subventricular

LISTA DE PUBLICAÇÕES REFERENTES AO PERÍODO DA TESE

Publicações relacionadas à tese:

BETTIO, L. E.; FREITAS, A. E.; NEIS, V. B.; SANTOS, D.B.; RIBEIRO, C. M.; ROSA, P. B.; FARINA, M.; Rodrigues, Ana Lúcia S. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 7-14, 2014.

BETTIO L. E. B.; NEIS, V. B.; PAZINI, F. L.; BROCARD, P. S.; PATTEN, A. R.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R.; RODRIGUES, A. L. S. The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation, **European Journal of Neuroscience**, In press. doi: 10.1111/ejn.13172.

BETTIO, L. E. B.; GIL-MOHAPEL, J.; RODRIGUES, A. L. S. Guanosine and Its Role in Neuropathologies. **Purinergic Signaling**. In press. doi: 10.1007/s11302-016-9509-4.

Publicações como co-autor durante o período:

NEIS, V. B.; MORETTI, M.; **BETTIO, L. E. B.;** RIBEIRO, C. M.; ROSA, P. B.; GONÇALVES, F. M., LOPES, M. W.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. S. Agmatine produces antidepressant-like effects by activating AMPA receptors and mTOR signaling. **European Neuropsychopharmacology**. In press. Doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.03.009

FREITAS, A. E.; **BETTIO, L. E.;** NEIS, V.B.; SANTOS, D. B.; RIBEIRO, C. M.; ROSA, P. B.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 143–150, 2014.

FREITAS, A. E.; **BETTIO, L. E. B.**; NEIS, V. B.; MORETTI, M.; RIBEIRO, C. M.; LOPES, M. W.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. S. Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 58, p. 137-146, 2014.

ROSA, P. B.; RIBEIRO, C. M.; **BETTIO, L. E. B.**; COLLA, A.; LIERBERKNECHT, V.; RODRIGUES, A. L. S. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 1-6, 2014.

MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A. R.; **BETTIO, L. E. B.**; OLIVEIRA, A.; PAZINI, F. L. ; DALMARCO, J. B. ; SIMIONATTO, E. L. ; PIZZOLATTI, M. G. ; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L.. **Food Chemistry**, v. 136, p. 999-1005, 2013.

CUNHA, M. P.; OLIVEIRA, A.; PAZINI, F. L.; MACHADO, D. G.; **BETTIO, L. E. B.**; BUDNI, J.; AGUIAR JR, A. S.; MARTINS, D. F.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. S. The antidepressant-like effect of physical activity in the voluntary running wheel. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, p. 851-859, 2013.

CUNHA, M. P.; PAZINI, F. L.; OLIVEIRA, A.; **BETTIO, L. E. B.**; ROSA, J. M.; MACHADO, D. G.; RODRIGUES, A. L. S. The activation of alpha1-adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in the tail suspension test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 44, p. 39-50, 2013.

CUNHA, M. P.; MACHADO, D. G.; CAPRA, J.C.; JACINTO, J.; **BETTIO, L. E. B.**; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. **Journal of Psychopharmacology (Oxford)**, v. 26, p. 1489-1501, 2012.

MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A.; GRANDO, J.; BROCARD, P. S.; **BETTIO, L. E. B.**; DALMARCO, J. B.; RIAL, D.; PREDIGER, R. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. S. Rosmarinus officinalis L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 158-169, 2012.

COLLA, A. R.; MACHADO, D. G.; **BETTIO, L. E. B.**; COLLA, G.; MAGINA, M. D. A.; BRIGHENTE, I. M.; RODRIGUES, A. L. S. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of Eugenia brasiliensis Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 720-731, 2012.

MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A. R.; GRANDO, J.; BROCARD, P. S.; **BETTIO, L. E. B.**; CAPRA, J. C.; RODRIGUES, A. L. S. Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 103, p. 220-229, 2012.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Depressão	29
1.1.1. Características da depressão	29
1.1.2. Regiões encefálicas envolvidas na depressão	31
1.1.3. Teoria monoaminérgica	33
1.1.4. Sistema glutamatérgico	36
1.1.5. Estresse.....	39
1.1.6. Relação entre o sistema glutamatérgico, o estresse e a depressão.....	40
1.1.7. Estresse oxidativo e depressão	44
1.1.8. Hipótese neurotrófica da depressão	49
1.1.9. Vias de sinalização intracelular envolvidas na depressão	54
1.1.10. Modelos animais de depressão	59
1.2. Guanosina	60
1.2.1. Sistema purinérgico.....	60
1.2.2. Papel dos nucleosídeos purinérgicos no encéfalo	63
1.2.3. Efeitos neurotróficos da guanosina	64
1.2.4. O papel da guanosina na transmissão glutamatérgica	66
1.2.5. Metabolismo e vias de sinalização ativadas pela guanosina	66
1.2.6. Efeitos da guanosina em neuropatologias.....	70
2. JUSTIFICATIVA	73
3. OBJETIVOS	75
3.1. Objetivo geral	75
3.2. Objetivos específicos.....	75
CAPÍTULO 1 – GUANOSINA PREVINE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E DANO OXIDATIVO INDUZIDOS PELO ESTRESSE DE CONTENÇÃO AGUDO.....	77
1. Materiais e métodos	77
1.1. Animais.....	77
1.2. Estresse agudo de contenção (EC).....	78
1.3. Teste do nado forçado (TNF)	79
1.4. Teste do campo aberto.....	80
1.5. Agentes farmacológicos e tratamento	81
1.6. Preparação do tecido	81
1.7. Atividade de enzimas antioxidantes.....	82
1.8. Conteúdo de glutathiona	82

1.9. Formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	83
1.10. Análise estatística.....	83
2. Resultados	83
2.1. Guanosina e fluoxetina previnem o aumento no tempo de imobilidade no TNF ocasionado pela exposição ao EC	83
2.2. Avaliação da atividade locomotora dos animais submetidos ao EC e tratados com guanosina ou fluoxetina no teste do campo aberto .	84
2.3. Efeito do pré-tratamento com guanosina na peroxidação lipídica hipocampal induzida pelo EC	85
2.4. Perfil antioxidante dos camundongos tratados com guanosina e submetidos ao EC.....	86
3. Discussão	91

CAPÍTULO 2 – O EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM GUANOSINA ESTÁ ASSOCIADO A UM AUMENTO NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL..... 97

1. Materiais e métodos.....	98
1.1. Animais.....	98
1.2. Agentes farmacológicos e tratamento	98
1.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	99
1.4. Teste do campo aberto	100
1.5. Processamento dos tecidos.....	100
1.6. Imunohistoquímicas	101
1.6.1. Ki-67	101
1.6.2. PCNA	102
1.6.3. NeuroD	102
1.7. Quantificação morfológica por microscopia convencional	102
1.8. Análise estatística.....	103
2. Resultados	103
2.1. Efeitos do tratamento crônico com guanosina ou fluoxetina no TSC e no teste do campo aberto.....	103
2.2. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou guanosina na proliferação celular hipocampal.....	105
2.3. Efeito do tratamento crônico com guanosina na diferenciação neuronal hipocampal	109
3. Discussão	113

CAPÍTULO 3 – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA, FLUOXETINA E CETAMINA EM MODELOS DE ESTRESSE CRÔNICO	121
1. Materiais e métodos	122
1.1. Animais	122
1.2. Agentes farmacológicos e tratamentos	122
1.3. Protocolos de estresse	123
1.3.1. Estresse crônico imprevisível (ECI).....	123
1.3.2. Modelo de estresse induzido por corticosterona.....	125
1.4. Teste de suspensão pela cauda (TSC)	125
1.5. Teste do campo aberto.....	125
1.6. Análise estatística	125
2. Resultados	126
2.1. Comparação entre os efeitos da guanosina, fluoxetina e cetamina no comportamento tipo-depressivo induzido por modelos de estresse	126
3. Discussão	128
4. CONCLUSÃO	131
5. PERSPECTIVAS.....	133
REFERÊNCIAS	135

APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado está organizada na forma de uma introdução geral, contendo o embasamento teórico relacionado aos experimentos realizados, seguida por três capítulos separados. Cada capítulo contém uma breve fundamentação teórica e seus respectivos materiais e métodos, resultados, discussão e os dados a respeito do artigo que deram origem.

Por fim, foi feita uma breve conclusão geral dos resultados obtidos. As referências bibliográficas foram organizadas em seção única, onde estão contidas todas as publicações que foram usadas como fonte e citadas no decorrer do presente trabalho.

Os tratamentos, protocolos de estresse e avaliações comportamentais referentes a todos os capítulos foram conduzidos no Laboratório de Neurobiologia da Depressão, sob orientação da Prof^a. Dra Ana Lúcia Severo Rodrigues. As análises bioquímicas referentes ao Capítulo 1 foram realizadas no Laboratório de Neurotoxicidade de Metais em colaboração com o Prof. Dr Marcelo Farina. Os experimentos imunohistoquímicos do Capítulo 2 foram conduzidos na Divisão de Ciências Médicas da University of Victoria (Canadá) sob coordenação do Prof. Dr Brian Christie.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Depressão

1.1.1. Características da depressão

O transtorno depressivo maior (que será tratado nesta tese como depressão) é uma condição psiquiátrica crônica, recorrente e debilitante, capaz de desencadear uma série de prejuízos na saúde do indivíduo e reduzir drasticamente sua qualidade de vida (KESSLER; BROMET, 2011). Segundo projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS), em meados do ano 2020, esse transtorno vai se tornar a segunda maior causa de incapacitação no mundo (REDDY, 2010; VOS et al., 2015). Além disso, sua elevada prevalência faz com que este seja considerado o transtorno psiquiátrico mais comum, sendo que o risco de um indivíduo sofrer uma manifestação clínica ao longo da vida pode chegar a níveis em torno de 20% (KESSLER et al., 2003, 2005; LOPEZ; MURRAY, 1998)

A depressão é caracterizada pela desregulação das funções afetivas e motivacionais tendo como sintomas centrais o humor deprimido e a anedonia (habilidade reduzida de sentir prazer). Essas alterações geralmente estão associadas a outras anormalidades como irritabilidade, disfunção cognitiva, distúrbios no sono e apetite, fadiga, alterações metabólicas, endócrinas e inflamatórias (LANG; BORGWARDT, 2013; NESTLER et al., 2002). O diagnóstico é baseado na observação clínica do paciente e requer a ocorrência de humor deprimido ou anedonia por um período mínimo de duas semanas. Além disso, para que o transtorno depressivo maior seja caracterizado é necessário também que a presença de um destes sintomas esteja associado a pelo menos 4 outros sintomas de uma lista de critérios, conforme ilustrado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Sumário dos sintomas para o diagnóstico clínico da depressão

1. humor deprimido
2. anedonia (perda de interesse ou prazer)
3. alterações significativas no peso
4. alterações significativas no apetite
5. agitação ou retardo psicomotor
6. fadiga excessiva
7. sentimentos de culpa ou desvalia excessivos
8. dificuldade de concentração, pensamento e tomada de decisões
9. pensamentos recorrentes de morte ou suicídio

Legenda: O diagnóstico do transtorno depressivo maior é feito através da observação clínica na qual a presença de pelo menos 5 dos sintomas acima listados devem estar presentes durante um período superior a duas semanas, sendo que necessariamente um dos sintomas deve ser um dos dois primeiros mencionados na tabela. *Fonte: American Psychiatric Association (2013).*

A depressão está associada a um elevado risco de morte, em parte, devido ao alto índice de suicídio associado a esse transtorno (ISOMETSA, 2014). Além disso, a presença da depressão pode piorar o prognóstico de diversas doenças crônicas como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, câncer e epilepsia, sendo que existem evidências de que este transtorno pode agir até mesmo como um fator causal para essas patologias (EVANS et al., 2005; KNOL et al., 2006). Da mesma forma, a depressão pode também ser um fator de risco ou apresentar comorbidade com diversas doenças neurológicas e/ou psiquiátricas como os transtornos de ansiedade, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (GREEN et al., 2003; MENZA et al., 2009; RUSH et al., 2005; SCHUURMAN et al., 2002). Entretanto, apesar da dimensão do problema que esse transtorno representa, a neurobiologia da depressão ainda está longe de ser inteiramente compreendida. Isso se deve ao fato de que nesse transtorno, anormalidades celulares e moleculares interagem com predisposições genéticas e fatores ambientais. Isso faz com que as características da depressão ocorram de forma muito heterogênea, apresentando uma complexidade que dificulta sua definição, diagnóstico e tratamento (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Somado a isso, o conhecimento que se tem atualmente sobre a depressão é considerado rudimentar em comparação a outras doenças crônicas de caráter possivelmente

multifatorial como a diabetes tipo 2. Isso se deve, entre outros fatores, a dificuldade de se observar alterações patológicas no cérebro e ao fato de que nossa compreensão sobre os fatores etiológicos envolvidos (como estresse crônico, anormalidades endócrinas, comorbidades e efeitos colaterais) ainda ser muito limitada (KRISHNAN; NESTLER, 2008).

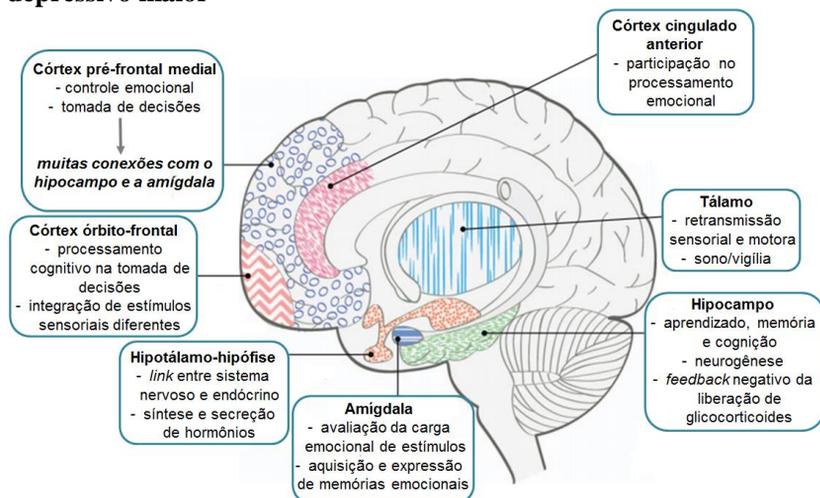
1.1.2. Regiões encefálicas envolvidas na depressão

Estudos de neuroimagem mensurando o fluxo sanguíneo e o metabolismo da glicose cerebral têm repetidamente constatado que a depressão está associada com a disfunção de diversas regiões corticais e límbicas implicadas no processamento emocional, sistemas de recompensa e funções executivas. Essa diversidade de regiões faz com que uma grande quantidade de circuitarias neurais estejam envolvidas com o transtorno, contribuindo para a variedade de sintomas observados (DREVETS, 2001; SHELINE, 2003). Alguns autores chegam a considerar a depressão como uma doença neurodegenerativa leve, cujo prejuízo pode ser revertido pelo tratamento (DUMAN; VOLETI, 2012). Isso se deve ao fato de que ocorre uma atrofia neuronal e glial em regiões encefálicas envolvidas nesse transtorno, principalmente no córtex pré-frontal e no hipocampo. Sendo assim, esse prejuízo é um fator importante envolvido no surgimento dos principais sintomas da depressão tais quais as alterações cognitivas e os sentimentos de culpa e desvalia característicos desse transtorno (HARRISON, 2002; KRISHNAN; NESTLER, 2008). Nesse contexto, o hipocampo tem sido particularmente investigado no campo da neurobiologia da depressão uma vez que essa estrutura: i) desempenha um papel fundamental no aprendizado, memória e regulação do humor (BANNERMAN et al., 2004; DENG; AIMONE; GAGE, 2010); ii) é uma estrutura rica em receptores para glicocorticoides (GCs) e anatomicamente conectada com o hipotálamo, exercendo feedback no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (PARIANTE; LIGHTMAN, 2008); iii) é uma região encefálica conhecida pela ocorrência de neurogênese no cérebro adulto, sendo uma das regiões cerebrais com maior neuroplasticidade (VAN PRAAG et al., 2002).

Uma vez que uma grande quantidade de projeções parte do córtex pré-frontal e do hipocampo, diversas circuitarias cortico-límbicas acabam sendo afetadas pela depressão, levando a disfunções em outras estruturas encefálicas, incluindo os córtex cingulado e órbito-frontal, a amígdala, o tálamo medial, o hipotálamo e o estriado, como ilustrado na Figura 1 (PALAZIDOU, 2012). Um exemplo de como essas projeções podem afetar o funcionamento de diversas estruturas encefálicas na depressão, pode ser ilustrado pela participação que o córtex pré-frontal tem no controle da

atividade da amígdala através de projeções inibitórias. Sendo assim, a atrofia estrutural no córtex pré-frontal ocasiona uma redução do controle inibitório sobre a amígdala com consequente hiperatividade dessa estrutura, um fator que tem sido apontado como uma das causas envolvidas na co-morbidade que a depressão apresenta com os transtornos de ansiedade e ataques de pânico (ROOZENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009; SHANSKY; MORRISON, 2009; SOTRES-BAYON; QUIRK, 2010). Da mesma forma, alterações estruturais envolvendo o núcleo accumbens têm sido associadas com a ansiedade e sintomas motivacionais (anedonia) frequentemente observados no transtorno, ao passo em que, anormalidades hipotalâmicas têm sido relacionadas com a desregulação do sono e apetite observada nos pacientes (BENNETT, 2011; NESTLER; CARLEZON, 2006; PALAZIDOU, 2012; SALOMON et al., 2003). Uma vez que esse sistema também está conectado com estruturas importantes do mesencéfalo/tronco encefálico, sua integridade é essencial para a manutenção da estabilidade emocional, resposta apropriada a estímulos, manutenção da neurotransmissão e funcionamento autonômico e endócrino (PALAZIDOU, 2012; SEMINOWICZ et al., 2004).

Figura 1. Estruturas corticais e límbicas implicadas no transtorno depressivo maior

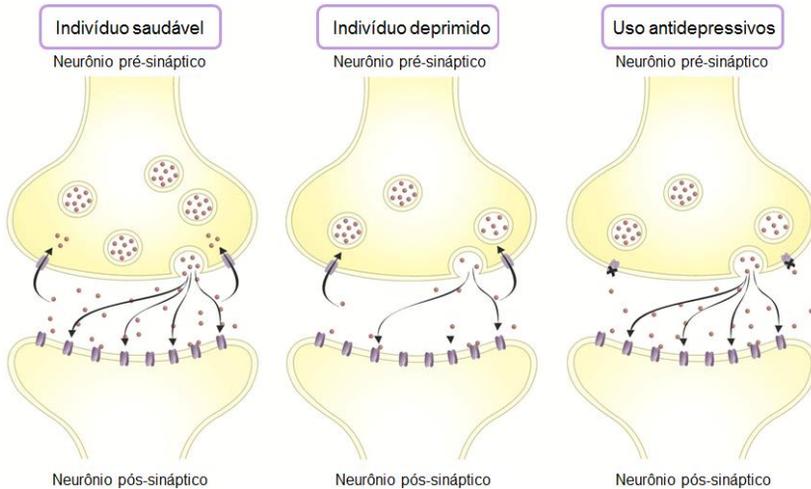


Legenda: A atrofia e hipofunção do córtex pré-frontal e hipocampo estão associadas com a disfunção de diversas outras regiões encefálicas conectadas a essas estruturas, levando a alterações cognitivas, comportamentais e neuroendócrinas. Nesse contexto, a diversidade de estruturas encefálicas conectadas com o córtex pré-frontal e o hipocampo se relaciona com a heterogeneidade dos sintomas observados no transtorno depressivo. *Fonte: Adaptado de Schloesser, Martinowich e Manji (2012).*

1.1.3. Teoria monoaminérgica

A terapia farmacológica para a depressão teve início nos anos 50 quando, durante testes clínicos para agentes contra a tuberculose foi observado que a iproniazida, um inibidor da enzima monoamina oxidase, desencadeava uma melhora significativa no humor dos pacientes (CRANE, 1957). Na mesma época, foi constatado que a imipramina, um fármaco que modula a transmissão monoaminérgica inibindo a recaptção de serotonina e noradrenalina, foi capaz de aliviar os sintomas da depressão (KUHN, 1958), dando início a teoria monoaminérgica do transtorno. A partir daí, foi postulado que a base fisiopatológica da depressão está relacionada a uma deficiência de monoaminas (serotonina e noradrenalina primeiramente, sendo a teoria estendida para dopamina posteriormente), e que o restabelecimento dessas é associado a uma melhora sintomática (HIRSCHFELD, 2000), como demonstrado na Figura 2.

Figura 2. Hipótese monoaminérgica da depressão



Legenda: Em neurônios com funcionamento normal, os neurotransmissores monoaminérgicos são liberados e se ligam a receptores específicos no neurônio pós-sináptico. Segundo a hipótese monoaminérgica da depressão, a concentração reduzida de monoaminas nas fendas sinápticas desencadeia o transtorno, ao passo em que fármacos que restabelecem seus níveis (como por exemplo bloqueando sua recepção), aumentam a concentração de neurotransmissores monoaminérgicos disponíveis nas sinapses levando a uma melhora sintomática. *Fonte: Adaptado de Castrén (2005).*

A imipramina e outros antidepressivos tricíclicos (os quais agem inibindo a recaptação de serotonina e noradrenalina) se tornaram então, a terapia farmacológica convencional para a depressão durante 30 anos, apesar de apresentarem efeitos colaterais em demasia (THASE, 2003). Mesmo com o surgimento de outras classes de antidepressivos nos anos 70, o tratamento da depressão só experimentou um avanço significativo novamente no final dos anos 80 com o surgimento dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Curiosamente, como já haviam fortes evidências suportando a hipótese serotoninérgica da depressão, os ISRS acabaram se tornando a primeira família de fármacos psicoativos desenvolvidos com base na busca de um mecanismo de ação específico pré-determinado. Nesse contexto, a fluoxetina, o primeiro ISRS

sintetizado, se tornou o antidepressivo mais prescrito mundialmente (LOPEZ-MUNOZ; ALAMO, 2009).

Apesar de bem tolerados em comparação aos antidepressivos anteriormente utilizados na clínica, os ISRS ainda apresentam uma série de problemas e estão longe de ser uma alternativa ideal para o tratamento da depressão. Isso se deve ao fato de que esses agentes farmacológicos apresentam um baixo índice de remissão dos sintomas, assim como a presença de sintomas residuais. Estima-se que aproximadamente 50% dos pacientes não respondem adequadamente à primeira terapia. Caso a resposta ao tratamento seja insuficiente com pelo menos dois antidepressivos diferentes, a depressão é considerada resistente ao tratamento, uma variante mais severa, geralmente associada à ansiedade e a um maior risco de suicídio (RUSH et al., 2006; SCHOSSER et al., 2012; TRIVEDI et al., 2006). A terapia farmacológica atualmente disponível apresenta também uma série de efeitos adversos incluindo sedação, alterações na pressão sanguínea e no peso, indigestão e disfunção sexual, sendo esses diretamente relacionados com a desistência do tratamento (KELLER et al., 2002). Além disso, esses agentes farmacológicos baseados no sistema monoaminérgico apresentam um efeito tardio, uma vez que os pacientes necessitam em torno de 3 a 4 semanas de tratamento para começarem a apresentar um alívio sintomático, um fenômeno considerado extremamente problemático em casos de pacientes com ideação suicida persistente (JACOBS; VAN PRAAG; GAGE, 2000). Levando em conta as desvantagens que os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da depressão apresentam, torna-se clara a necessidade do desenvolvimento de agentes terapêuticos que possam agir de forma rápida e persistente no alívio dos sintomas, principalmente para os pacientes que não respondem à terapia convencional (BROWNE; LUCKI, 2013).

Uma vez que o efeito dos antidepressivos convencionais sobre as monoaminas é imediato (NICIU et al., 2013a), a presença de um efeito clínico tardio indica que a teoria monoaminérgica ainda é uma ideia muito simplista para explicar um transtorno complexo como a depressão. Levando em conta que o aumento nos níveis de monoaminas na fenda sináptica desencadeia uma série de alterações em vias de sinalização intracelulares e na atividade de outros sistemas de neurotransmissão, novos estudos têm buscado identificar eventos mais relevantes para a ocorrência do efeito terapêutico dos antidepressivos convencionais. Dessa forma, novos alvos mais precisos envolvendo outros neurotransmissores (particularmente o glutamato), a manipulação de vias de sinalização intracelular específicas e de fatores de crescimento como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), têm se mostrado promissores

para o desenvolvimento de uma nova geração de antidepressivos (LOPEZ-MUNOZ; ALAMO, 2009).

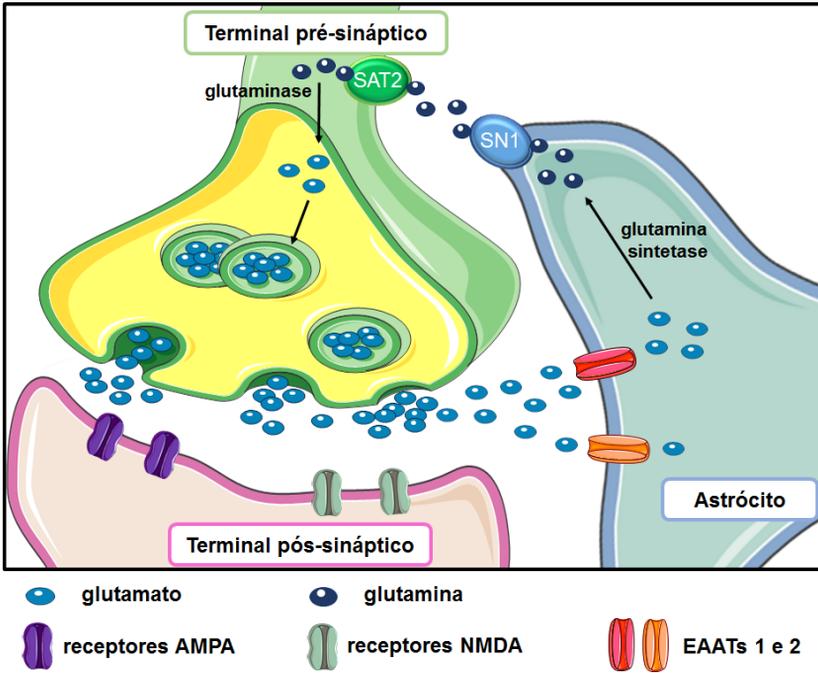
1.1.4. Sistema glutamatérgico

O glutamato é um aminoácido presente em todos os tipos celulares do organismo sendo que, no sistema nervoso central (SNC), pode ser estocado em vesículas e liberado dos neurônios mediante despolarização (TAKAMORI, 2006) ou de células da glia através de diversos mecanismos distintos (MALARKEY; PARPURA, 2008). Durante o desenvolvimento do encéfalo, esse neurotransmissor possui um papel importante na migração, diferenciação e sobrevivência neuronal, assim como na sinaptogênese e apoptose (MATTSON, 1996; SPITZER, 2006). Mesmo na fase adulta, é considerado o principal mediador excitatório do SNC, estando envolvido com o funcionamento de uma grande quantidade de processos como cognição, memória e aprendizado (RAHN; SLUSHER; KAPLIN, 2012; RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003). A importância do glutamato no SNC é enfatizada por evidências metabólicas que apontam que quase toda a glicose que entra no cérebro acaba sendo convertida nesse neurotransmissor (SHEN et al., 1999; SIBSON et al., 1998).

As respostas endógenas do glutamato são mediadas por receptores de membrana farmacologicamente e funcionalmente distintos tanto do tipo ionotrópico como metabotrópico (mGluR) (KEW; KEMP, 2005). Os do tipo ionotrópico incluem as famílias de receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato, ao passo em que os metabotrópicos incluem os receptores glutamatérgicos acoplados à proteína G (sub-tipos mGluR1 a mGluR8) (PAUL; SKOLNICK, 2003). Quando liberado na fenda sináptica, o glutamato age sobre esses receptores, sendo em seguida removido pelos astrócitos e convertido intracelularmente em glutamina, através da ação da enzima glutamina sintetase. Os mecanismos que permitem que essa glutamina seja utilizada pelos neurônios novamente dependem do efluxo desse aminoácido dos astrócitos para o meio extracelular, seguido pelo influxo para o interior neuronal, sendo ambos os eventos mediados por transportadores específicos Na^+ -dependentes. Nesse contexto, a glutamina presente no interior dos astrócitos é liberada através do sistema N de transporte 1 (SN1), sendo em seguida captada pelo terminal pré-sináptico adjacente através do sistema A de transporte 2 (SAT2) (JENSTAD et al., 2009). Uma vez no interior dos neurônios, a glutamina pode ser convertida novamente em glutamato pela enzima glutaminase, sendo subsequentemente estocado em vesículas sinápticas novamente, como ilustrado na Figura 3 (NICIU; KELMENDI; SANACORA, 2012).

Os processos astrocitários são reconhecidos como um terceiro componente funcional da sinapse, envolvendo a mesma e contribuindo para seu funcionamento. Nesse contexto, essas células da glia desempenham um papel crucial na transmissão sináptica, regulando as concentrações de K^+ , liberando gliotransmissores e modulando a ativação dos receptores glutamatérgicos através da captação desse neurotransmissor (HUANG; BERGLES, 2004). Esse conceito é denominado sinapse tripartite (ARAQUE et al., 1999; HALASSA; FELLIN; HAYDON, 2007) e permite que a localização dos transportadores gliais seja otimizada, prevenindo a estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos (SORIANO; HARDINGHAM, 2007). Essa modulação é importante porque, apesar de seu papel no funcionamento neuronal, o glutamato pode agir como uma potente neurotoxina. A ocorrência de dano ou morte celular relacionada com a estimulação excessiva de receptores glutamatérgicos é chamada excitotoxicidade, um fenômeno que contribui na fisiopatologia de diversas doenças do SNC (DONG; WANG; QIN, 2009). Sendo assim, uma vez que o glutamato não dispõe de um sistema enzimático capaz de metabolizar rapidamente esse neurotransmissor na fenda sináptica, um mecanismo eficiente de captação é necessário para manter o controle de suas concentrações no espaço extracelular (DANBOLT, 2001). O transporte de glutamato na fenda sináptica é realizado por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) presentes tanto em células da glia (EAATs 1 e 2) como em neurônios (EAATs 3-5) (DANBOLT, 2001). Entretanto, apesar de também presentes na membrana neuronal, os transportadores de glutamato gliais são o principal mecanismo de remoção desse neurotransmissor, permitindo a manutenção de concentrações de glutamato abaixo de níveis tóxicos na fenda sináptica (ANDERSON; SWANSON, 2000; DANBOLT, 2001).

Figura 3. O ciclo glutamato-glutamina na sinapse



Legenda: O glutamato neuronal é sintetizado a partir da glicose (não mostrado) ou glutamina. Após liberado no espaço extracelular, o glutamato se liga a receptores específicos tais quais os receptores ionotrópicos do tipo alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) ou *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Os níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica são controlados por um sistema de captação, sendo os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) 1 e 2 (presentes nos astrócitos) o principal mecanismo. Uma vez captado, esse neurotransmissor é convertido em glutamina no interior dos astrócitos através da enzima glutamina sintetase. A partir daí a glutamina pode ser subsequentemente liberada para o meio extracelular pelo sistema N de transporte 1 (SN1), onde é captada pelo terminal pré-sináptico através do sistema A de transporte 2 (SAT2) e convertida novamente em glutamato pela ação da enzima glutaminase. *Fonte: Produzida pelo autor com permissão de Servier Medical Art (www.servier.com).*

1.1.5. Estresse

Apesar de o estresse ser uma resposta fisiológica comum e praticamente todos os organismos terem desenvolvido mecanismos para lidar com eventos estressores, sua exposição crônica pode se tornar um fator desencadeante para eventos fisiopatológicos (KUMAR et al., 2013). De fato, mesmo a ocorrência de um estressor agudo, quando em intensidade elevada, pode levar a uma resposta inapropriada a nível de neurotransmissores, hormônios e citocinas pró-inflamatórias, capaz de desencadear eventos patológicos no organismo (MUSAZZI et al., 2010; POPOLI et al., 2012). Sendo assim, o estresse é reconhecido como um fator de risco importante para a ocorrência de doenças cardiovasculares, metabólicas e transtornos neuropsiquiátricos, incluindo a depressão (CHROUSOS; KINO, 2007; DEDERT et al., 2010; MCEWEN, 2004).

O estresse leva a ativação do eixo HPA, culminando na produção de GCs pelas adrenais, os quais são hormônios esteroides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) que podem agir no SNC através de receptores específicos. Essa ação leva a ativação tanto de mecanismos de resposta rápida (não-genômicos) como de resposta lenta (através de alterações na transcrição gênica) (GROENEWEG et al., 2011; LUPIEN et al., 2009; TASKER; DI; MALCHER-LOPES, 2006). A atividade dos GCs pode ser mediada por dois tipos de receptores, os receptores mineralocorticoides (RM) e os receptores de glicocorticoides (RG), sendo que os primeiros possuem muito mais afinidade para GCs, estando geralmente ativados na presença de baixas concentrações desses hormônios. Entretanto, em situações de estresse, ocorre um pico na liberação de GCs e os RGs passam a ser progressivamente ativados (REUL; DE KLOET, 1985). A ativação excessiva de RGs tem sido relacionada com a atrofia e morte neuronal por diversos mecanismos tais quais a inibição da neurogênese hipocampal (SAALTINK; VREUGDENHIL, 2014) e ativação de cascatas apoptóticas (ALMEIDA et al., 2000). Um dos principais fatores envolvidos nesses eventos é a ocorrência de excitotoxicidade glutamatérgica, uma vez que os GCs estão associados com a rápida liberação de glutamato em diversas regiões límbicas e corticais, incluindo o hipocampo, o córtex pré-frontal e a amígdala (LOWY; WITTENBERG; YAMAMOTO, 1995; VENERO; BORRELL, 1999). Além disso, sabe-se que o estresse é associado também com a ocorrência de uma redução na expressão de transportadores de glutamato no hipocampo, aumentando a probabilidade de que esse neurotransmissor cause dano neuronal (YANG; HUANG; HSU, 2005; ZINK et al., 2010). Sendo assim, a exposição a estressores agudos de alta intensidade ou ao estresse crônico, tem sido relacionada com eventos

decorrentes da excitotoxicidade glutamatérgica, tais quais a disfunção mitocondrial, geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e morte celular (GONG et al., 2011; MUSAZZI et al., 2010; POPOLI et al., 2012; YOU et al., 2009). Cabe ressaltar que esses prejuízos causados pelo estresse no hipocampo são agravados ainda mais pela ocorrência de alterações no suporte trófico, como a redução na expressão de BDNF (GRØNLI et al., 2006; MURAKAMI et al., 2005) e na neurogênese hipocampal (WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006).

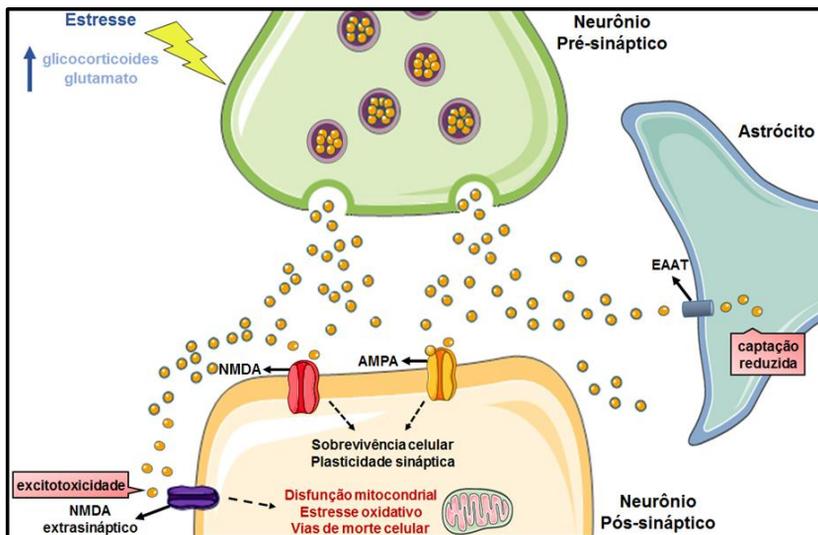
1.1.6. Relação entre o sistema glutamatérgico, o estresse e a depressão

A interferência do estresse com mecanismos de neuroplasticidade faz com que este seja considerado um dos principais fatores de risco para a ocorrência do transtorno depressivo (PITTENGER; DUMAN, 2008). De fato, a indução do excesso de GCs em modelos animais, tanto pela exposição a eventos estressores quanto pela administração exógena de corticosteroides, é capaz de ocasionar alterações estruturais no hipocampo e sintomas semelhantes aos observados na depressão humana (ANDRADE; RAO, 2010). O hipocampo desempenha um papel-chave na relação entre estresse e depressão por ser uma estrutura encefálica particularmente vulnerável aos efeitos do estresse, uma vez que possui uma das maiores concentrações de receptores para GCs no cérebro de mamíferos (KIM; DIAMOND, 2002; MACQUEEN; FRODL, 2011). Além disso, o hipocampo desempenha um papel significativo na regulação do *feedback* negativo do eixo HPA, inibindo a resposta endócrina hipotalâmica. O prejuízo funcional nessa estrutura e desregulação desse *feedback* prejudica o controle da liberação hipotalâmica de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual estimula a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), levando a produção de GCs pelas adrenais. Sendo assim, a desregulação desse sistema ocasionada pela atrofia hipocampal em pacientes depressivos leva a um ciclo vicioso, no qual uma resposta inapropriada a estímulos estressores potencializa os efeitos deletérios do estresse (SAPOLSKY, 2001; SNYDER et al., 2011; YOUNG et al., 1991). Adicionalmente, a interconectividade e influência que o hipocampo exerce sobre diversas outras regiões encefálicas, faz com que seu prejuízo funcional induzido pelo estresse contribua para disfunções neuroquímicas em diversas outras estruturas córtico-límbicas implicadas na depressão (DÉGENÈTAIS et al., 2003; GODSIL et al., 2013; ISHIKAWA; NAKAMURA, 2003; PRICE; DREVETS, 2010).

A ideia de que o equilíbrio entre a liberação de glutamato e sua capacidade de captação pelos astrócitos encontra-se prejudicado no transtorno depressivo tem sido sugerida por um número crescente de

evidências (BANASR et al., 2010; PITTENGER; DUMAN, 2008). Nesse contexto, diversos estudos *post-mortem* têm confirmado uma redução na densidade astrocitária no córtex pré-frontal de pacientes depressivos (COTTER et al., 2001, 2002; KUGAYA; SANACORA, 2005; MCNALLY; BHAGWAGAR; HANNESTAD, 2008; RAJKOWSKA; STOCKMEIER, 2013). Além disso, existem evidências indicando a ocorrência de uma redução na expressão dos transportadores de glutamato gliais (EAATs 1 e 2) em amostras *post-mortem* de córtex pré-frontal de pacientes acometidos por esse transtorno (CHOUDARY et al., 2005; MIGUEL-HIDALGO et al., 2010). Sendo assim, como ilustra a Figura 4, possivelmente a ocorrência de uma liberação excessiva de glutamato induzida pelos GCs, associada a uma redução na capacidade astrocitária de captar esse neurotransmissor da fenda sináptica, sejam eventos relacionados com o desencadeamento de eventos excitotóxicos que contribuem para a atrofia e morte neuronal que ocorrem na depressão (DUMAN, 2009; KUDRYASHOVA, 2015). Esses eventos parecem ser mediados em parte por uma estimulação excessiva de sub-tipos específicos de receptores mGluR e consequente redução na plasticidade sináptica (CHAOULOFF; HÉMAR; MANZONI, 2007; MITSUKAWA et al., 2006; MUKHERJEE et al., 1999; POPOLI et al., 2012). Além disso, o extravasamento do excesso de glutamato para fora da sinapse e estimulação de receptores NMDA extrasinápticos (particularmente receptores que possuem a subunidade GluN2B) parece também ter um papel importante na atrofia e morte neuronal induzida pelo excesso de glutamato na depressão (AUTRY et al., 2011; HARDINGHAM; BADING, 2010).

Figura 4. Efeitos do estresse sobre a sinapse glutamatérgica



Legenda: Em condições normais, o glutamato possui um papel-chave na plasticidade sináptica, principalmente através da ativação de seus receptores sinápticos do tipo alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Entretanto, a exposição ao estresse crônico ou a estressores agudos de alta intensidade pode levar a um aumento nos níveis de glicocorticoides e liberação excessiva de glutamato. Esse efeito, associado com o prejuízo que o estresse ocasiona na capturação de glutamato pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) gliais, leva ao extravasamento desse neurotransmissor e consequente ativação de seus receptores extrasinápticos. Esse processo pode resultar na ocorrência de eventos excitotóxicos como o aumento excessivo nas concentrações de Ca^{2+} intracelular, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, culminando em atrofia e/ou morte celular. *Fonte: Produzida pelo autor com permissão de Servier Medical Art (www.servier.com).*

De fato, diversos moduladores do sistema glutamatérgico possuem propriedades antidepressivas e têm contribuído para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos no transtorno depressivo maior. A hipótese de que esses agentes são um alvo promissor para a busca de novos antidepressivos teve início após uma observação clínica de que a

cetamina, um antagonista de receptores NMDA, leva a uma melhora rápida nos sintomas depressivos (BERMAN et al., 2000). A partir desse trabalho, vários estudos replicaram esse resultado em um número crescente de pacientes, constatando a existência de diversas vantagens do efeito antidepressivo da cetamina em comparação com a terapia farmacológica convencional. Dentre essas, está o fato de que esse efeito é persistente (durando até uma semana após administração com dose única), assim como reproduzível em casos de depressão resistente ao tratamento. A cetamina se mostrou também capaz de resolver rapidamente a ideação suicida em situações emergenciais, inaugurando o que possivelmente possa se tornar uma nova era para a terapia antidepressiva (DIAZGRANADOS et al., 2010; IRWIN; IGLEWICZ, 2010; MURROUGH et al., 2013; ZARATE JR. et al., 2006).

Curiosamente, apesar de o glutamato ter um papel-chave no dano hipocampal induzido pelo estresse, a atividade desse neurotransmissor através da estimulação dos receptores tipo AMPA parece ter um papel importante na indução de uma resposta antidepressiva de ação rápida e eficaz (DUMAN; VOLETI, 2012). De fato, esse mecanismo parece estar implicado na capacidade que alguns antagonistas de receptores NMDA têm de reverter rapidamente os efeitos deletérios do estresse, ao passo em que os antidepressivos convencionais só são capazes de desencadear esse tipo de resposta após tratamento crônico (LI et al., 2011). Estudos com a cetamina têm auxiliado a elucidar esse mecanismo, sugerindo que a administração de baixas doses desse agente farmacológico: 1) estimula a liberação de glutamato sináptico e a sinalização via receptores AMPA e 2) bloqueia a atividade de receptores NMDA extrasinápticos, impedindo que o extravasamento de quantidades excessivas de glutamato para fora da fenda sináptica ative vias de sinalização relacionadas aos efeitos neurotóxicos desse neurotransmissor (KRYSTAL; SANACORA; DUMAN, 2013). Dessa forma, moduladores glutamatérgicos capazes de ativar mecanismos que favoreçam a plasticidade sináptica e/ou inibir mecanismos associados com a ativação de cascatas que culminam na atrofia e morte neuronal têm sido alvos de investigação, incluindo potenciadores da atividade de receptores AMPA e antagonistas da sub-unidade GluN2B de receptores NMDA (KNAPP et al., 2002; LI et al., 2011; MACHADO-VIEIRA et al., 2009). Além disso, a estimulação da captação de glutamato também é uma abordagem importante a ser investigada, uma vez que esse mecanismo parece ser capaz de reduzir a estimulação de receptores glutamatérgicos perisinápticos e extrasinápticos to tipo mGluR e NMDA ao mesmo tempo em que exerce pouca influência sobre o potencial excitatório mediado por receptores AMPA (PIET et al.,

2004; ZHENG; SCIMEMI; RUSAKOV, 2008). De fato, estudos clínicos preliminares com o riluzol (um composto que estimula a captação de glutamato pelos astrócitos) sugerem que esse agente farmacológico é capaz de ocasionar uma atividade antidepressiva em pacientes resistentes à terapia convencional e/ou que apresentam sintomas residuais (SANACORA et al., 2007; ZARATE et al., 2004).

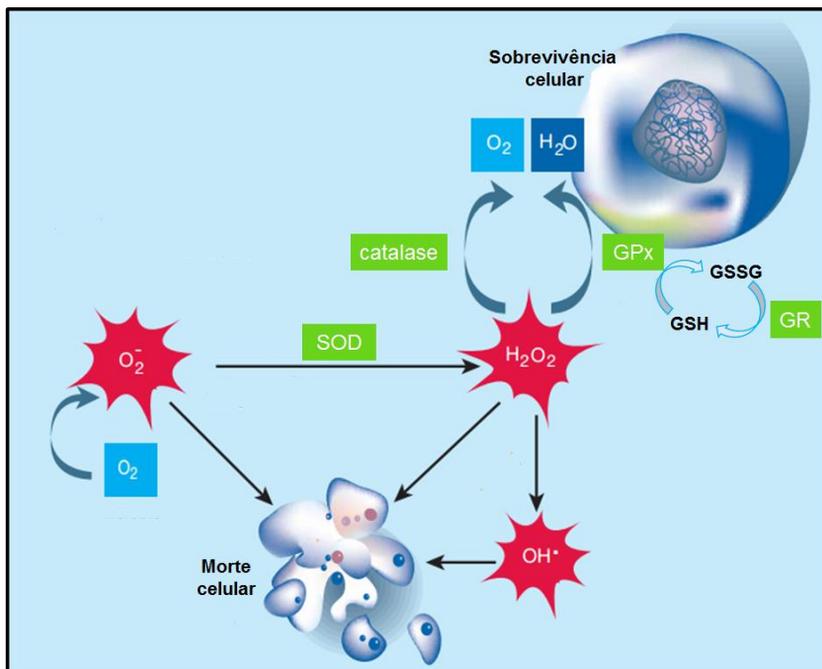
Cabe ressaltar que, apesar desses compostos superarem muitas desvantagens da terapia antidepressiva convencional, ainda existem efeitos adversos a se levar em conta, como por exemplo as propriedades psicomiméticas e o potencial de abuso apresentados pela cetamina, além da possibilidade de causar efeitos neurotóxicos se administrada cronicamente. Entretanto, as características distintas do efeito antidepressivo de moduladores glutamatérgicos sugerem o envolvimento de mecanismos de ação que diferem dos da terapia convencional, revelando novos paradigmas para futuros estudos com agentes antidepressivos em potencial (BROWNE; LUCKI, 2013).

1.1.7. Estresse oxidativo e depressão

Uma vez que a utilização do oxigênio molecular (O_2) é um pré-requisito para a maior parte das formas de vida, os organismos desenvolveram uma diversidade de metaloenzimas para tirar vantagem da interação entre o O_2 e íons metálicos. Como sub-produto do metabolismo do O_2 , EROs são formadas, as quais possuem um papel na sinalização celular e homeostase. Entretanto, apesar de as EROs serem parte intrínseca do metabolismo, devido a sua alta toxicidade, as células desenvolveram mecanismos próprios para lidar com níveis elevados dessas moléculas (BARNHAM; MASTERS; BUSH, 2004). O precursor da maior parte das EROs é o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), um produto da redução parcial do O_2 , formado principalmente na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. A dismutação do $O_2^{\cdot-}$ produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, por sua vez, pode ser totalmente reduzido a água ou parcialmente reduzido a radical hidroxila (OH^{\cdot}), um dos oxidantes mais potentes encontrados na natureza (TURRENS, 2003). Embora as EROs tenham uma participação na atividade celular, o desequilíbrio entre sua geração e capacidade de neutralização pelas defesas antioxidantes desencadeia um processo conhecido como estresse oxidativo. Isso ocorre porque a alta reatividade das EROs permite que essas interajam com importantes componentes celulares incluindo proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos, podendo levar à morte celular e contribuir para o surgimento de diversas patologias (OTT et al., 2007).

A primeira linha de defesa contra a geração de $O_2^{\cdot-}$ em humanos é a enzima superóxido dismutase (SOD), a qual acelera a dismutação desse ânion, podendo existir em três isoformas distintas. Sendo assim, as SOD1 e SOD3 utilizam Cu e Zn como cofatores, sendo que, a primeira pode ser encontrada no citoplasma e espaço intermembranar das mitocôndrias ao passo em que, a segunda age no meio extracelular. A SOD2, por sua vez, usa Mn como cofator e encontra-se localizada na matriz mitocondrial (MUSCOLI et al., 2003). Como demonstrado na Figura 5, a reação catalisada pela SOD usando $O_2^{\cdot-}$ como substrato tem como produto o H_2O_2 , uma molécula mais estável e que pode atravessar a membrana celular por difusão. O H_2O_2 pode dar origem a radicais OH^{\cdot} na presença de metais de transição. Sendo assim, a ação coordenada da SOD com as enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), as quais são capazes de decompor o H_2O_2 , protege contra o dano oxidativo (SCHREIBELT et al., 2007). A detoxificação de peróxidos exercida pela GPx é acoplada a redução da disponibilidade de glutathiona (GSH; um tripeptídeo considerado o tiol não-proteico mais abundante nas células de mamíferos), devido a sua oxidação, a qual forma glutathiona oxidada (GSSG). Dessa forma a GSSG pode ser reduzida novamente a GSH por uma enzima chamada glutathiona redutase (GR) dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). Além de servir como substrato para o ciclo redox citosólico, a GSH pode também agir como co-fator na detoxificação de xenobióticos ou agir diretamente na inativação de EROs como $O_2^{\cdot-}$ ou OH^{\cdot} (FOYER; NOCTOR, 2011).

Figura 5: Principais enzimas antioxidantes presentes nas células de mamíferos



Legenda: O ânion superóxido (O_2^-) é um radical livre produto do metabolismo aeróbico. Essa molécula pode ser neutralizada pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, através da ação das enzimas catalase ou glutatona peroxidase (GPx), o H_2O_2 é convertido em H_2O , permitindo a sobrevivência celular. Caso não ocorra a remoção adequada do H_2O_2 , esta molécula pode dar origem a radicais OH^\cdot , os quais são extremamente reativos. O desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e a capacidade da célula de neutralizar essas moléculas causa uma série de eventos bioquímicos que podem culminar na morte celular. Para funcionar de forma eficiente, a GPx requer a ação de enzimas secundárias e cofatores, incluindo a glutatona (GSH) e a glutatona redutase (GR). A GR, por sua vez, reduz a glutatona oxidada (GSSG), permitindo que esta seja convertida novamente em GSH e possa ser utilizada em novas reações.

Fonte: Adaptado de Cleveland e Kastan (2000).

O SNC é particularmente vulnerável a geração excessiva de EROs devido ao seu alto consumo de oxigênio. Esse consumo se deve principalmente ao fato de que grandes quantidades de adenosina 5'-trifosfato (ATP) são necessárias para a manutenção da homeostase iônica intracelular nos neurônios, uma vez que, devido a atividade de canais iônicos associados com a propagação de potenciais de ação e neurosecreções, uma grande quantidade de ATPases é utilizada para manter o gradiente eletroquímico das membranas neuronais (HALLIWELL, 2006). Como mencionado anteriormente, apesar do papel do glutamato na plasticidade neural (MATTSON, 2008), a estimulação excessiva de seus receptores pode levar a um desequilíbrio na homeostase do cálcio, o qual interfere com a função mitocondrial levando a um aumento na geração de EROs (HARDINGHAM; FUKUNAGA; BADING, 2002; REYNOLDS; HASTINGS, 1995). Além de possuir efeitos nocivos *per se*, o estresse oxidativo pode também ocasionar a liberação de aminoácidos excitatórios, levando a um ciclo vicioso de eventos neurotóxicos (MAILLY et al., 1999).

Considerando o papel crítico que esses eventos desempenham na patogênese de diversas disfunções do SNC, o estresse oxidativo tem sido apontado como um importante mecanismo envolvido nos eventos bioquímicos e morfológicos subjacentes a grande parte das neuropatologias, incluindo transtornos psiquiátricos como a depressão (HALLIWELL, 2006; LIN; BEAL, 2006; SARANDOL et al., 2007). De fato, achados clínicos demonstram que pacientes depressivos possuem níveis plasmáticos de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 significativamente elevados em comparação ao grupo controle (SZUSTER-CIESIELSKA et al., 2008). Além disso, pacientes depressivos também apresentam concentrações plasmáticas elevadas de malondialdeído (MDA), um produto da degradação dos lipídeos de membrana (peroxidação lipídica) comumente usado como biomarcador para a ocorrência de estresse oxidativo (GALECKI et al., 2009; OZCAN et al., 2004). Adicionalmente, a hipótese de que pacientes depressivos apresentam níveis elevados de estresse oxidativo é ainda suportada pela observação clínica de que esses apresentam disfunção mitocondrial (GARDNER et al., 2003; SHAO et al., 2008) e níveis elevados de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (um biomarcador de dano oxidativo no DNA) (FORLENZA; MILLER, 2006; IRIE; MIYATA; KASAI, 2005). É importante salientar também que foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de estresse oxidativo em pacientes depressivos e a severidade dos sintomas apresentados pelos mesmos (YANIK; EREL; KATI, 2004).

O aumento na ocorrência de estresse oxidativo que acompanha a depressão está relacionado também a alterações nos níveis de enzimas antioxidantes endógenas, uma vez que estas reagem à presença de EROs, assim como no conteúdo do peptídeo GSH. Nesse contexto, níveis séricos reduzidos de GSH foram reportados pela primeira vez em pacientes psiquiátricos já no início do século passado (LOONEY; CHILDS, 1934). Apesar dessa observação inicial, apenas recentemente esse assunto se tornou foco de interesse novamente, uma vez que a ocorrência de uma redução nos níveis séricos de GSH foi de fato confirmada em pacientes depressivos (KODYDKOVÁ et al., 2009; RYBKA et al., 2013). Entretanto, os dados encontrados na literatura relacionados à atividade das enzimas SOD, GPx e CAT ainda são controversos, existindo tanto estudos mostrando um aumento, quanto uma redução na atividade dessas enzimas antioxidantes no soro de pacientes acometidos pelo transtorno (BILICI et al., 2001; GALECKI et al., 2009; KODYDKOVÁ et al., 2009; OZCAN et al., 2004; SARANDOL et al., 2007).

O estresse oxidativo contribui para a fisiopatologia da depressão tanto pela reatividade das EROs com importantes componentes celulares, quanto por ativar mecanismos de sinalização que levam a ocorrência de um quadro de neuroinflamação e redução na neuroplasticidade (MAES et al., 2011). Nesse cenário, um crescente número de evidências tem demonstrado que o efeito terapêutico do tratamento crônico com antidepressivos convencionais ocorre com a reversão desse quadro em associação com o restabelecimento do equilíbrio redox (HERKEN et al., 2007; KHANZODE et al., 2003; KOTAN et al., 2011). Esses agentes farmacológicos também revertem as alterações na atividade de antioxidantes endógenos que acompanham o transtorno depressivo e reduzem os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo (BILICI et al., 2001; GALECKI et al., 2009). Sendo assim, novos alvos para o tratamento da depressão têm sido considerados para investigação baseados em suas propriedades antioxidantes (LEE et al., 2013; MAES et al., 2012). Entre esses alvos, merece destaque a investigação de compostos capazes de ativar o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), um fator de transcrição considerado uma das maiores respostas adaptativas a alterações no estado redox do encéfalo (MAES et al., 2012). O Nrf2 age em resposta a estressores oxidantes, mediando a transcrição de diversos genes que desencadeiam uma resposta antioxidante através da codificação de enzimas e fatores essenciais para a sobrevivência neuronal (JOHNSON et al., 2008). Esse fator de transcrição é essencial para a indução coordenada de genes que codificam proteínas como a SOD, a GPx, a CAT e enzimas diretamente envolvidas com a síntese de GSH (BANNING et al., 2005; CHAN; KAN,

1999). Além disso, a ativação do Nrf2 também leva a expressão de heme oxigenase 1 (HO-1), uma enzima que desempenha um papel importante na capacidade celular de resistir a danos oxidativos (MARTIN et al., 2004).

1.1.8. Hipótese neurotrófica da depressão

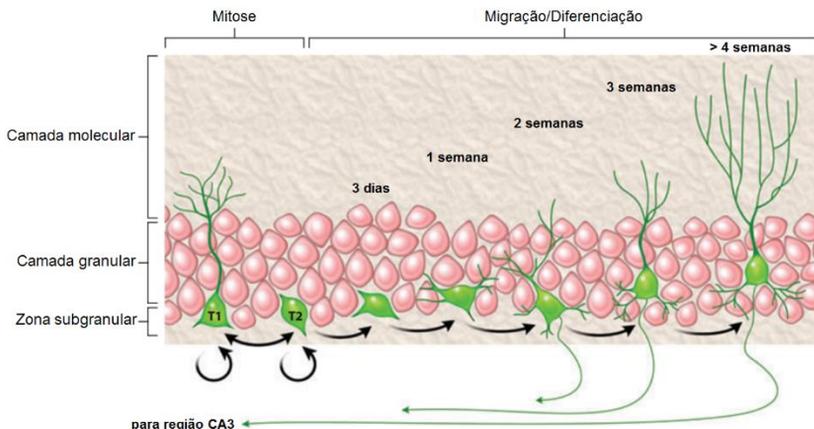
A neurogênese adulta se tornou foco de particular interesse desde que, nas últimas décadas, tem sido demonstrado que o SNC é capaz de gerar novos neurônios e células da glia e estabelecer novos circuitos. Nesse contexto, duas regiões encefálicas possuem precursores neurais capazes de gerar neurônios que possam ser integrados nessas novas circuitarias: a zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (ZSG) do giro denteado (GD) hipocampal (VILLANUEVA, 2013). Apesar de a importância funcional da neurogênese no cérebro adulto ainda ser alvo de debate, diversos estudos têm comprovado a função dos neurônios produzidos na ZSV no sistema olfatório, assim como o papel dos produzidos na ZSG como mediadores da função do hipocampo (DENG; AIMONE; GAGE, 2010).

Como mencionado anteriormente, o hipocampo é uma estrutura límbica que desempenha um papel importante na formação de certos tipos de memória (como a espacial), assim como na regulação de aspectos afetivos (SAHAY; HEN, 2007; SQUIRE, 1992). Entretanto, essas funções não estão localizadas de forma homogênea nessa estrutura, uma vez que o hipocampo e seu GD possuem diferentes padrões de expressão gênica e projeções anatômicas ao longo de seu eixo dorsal/ventral. O hipocampo dorsal (definido como 50% do volume hipocampal a partir do polo septal) se comunica com regiões encefálicas associadas com aspectos cognitivos, sendo portanto primariamente envolvido com processos de aprendizado e memória. Por outro lado, o hipocampo ventral (definido como 50% do volume hipocampal a partir do polo temporal) contribui com respostas emocionais, possuindo um papel importante em comportamentos motivacionais e afetivos (BANNERMAN et al., 2004; FANSELOW; DONG, 2010).

Na ZSG dessa estrutura, existem dois tipos de células-tronco (denominadas tipo 1 e tipo 2). A primeira semana da neurogênese nessa estrutura tem início com a proliferação das células tipo 1 (de divisão lenta), as quais são células com características morfológicas e funcionais semelhantes às de células da glia (EHNINGER; KEMPERMANN, 2008). As células tipo 1 dão origem às células proliferativas tipo 2, cuja morfologia deixa de se assemelhar com a de células da glia, adquirindo um fenótipo de pequenas células com curtos processos tangenciais (HSIEH, 2012). Essas células são também conhecidas como células amplificadoras

transitórias por exibirem altos níveis de proliferação (ZHAO; DENG; GAGE, 2008). Durante a segunda semana, as células tipo 2 entram em processo de diferenciação a fim de se tornar neurônios ou células da glia. Baseado em diferenças no padrão de expressão gênica, essas células podem ser divididas nos tipos 2a (células que ainda expressam marcadores característicos de células-tronco neurais) e 2b (células no estágio inicial de comprometimento neuronal) (LAZAROV et al., 2010). Essas células continuam a proliferar, dando origem às células do tipo 3 (neuroblastos), as quais migram uma curta distância na camada de células granulares e começam a desenvolver processos celulares, com dendritos se estendendo através da camada molecular e axônios crescendo através do hilo em direção a região *cornu ammonis 3* (CA3) do hipocampo (Figura 6) (ESPÓSITO et al., 2005; ZHAO et al., 2006). A integração com a circuitaria local ocorre durante a terceira semana deste processo, quando os novos neurônios gerados começam a desenvolver espinhos dendríticos e formar conexões aferentes e eferentes (TONI et al., 2007; ZHAO et al., 2006). Curiosamente, entre a 4^a e a 6^a semana de idade, os neurônios recém-nascidos no cérebro adulto de roedores exibem uma plasticidade sináptica ainda mais forte que os maduros, permitindo a existência de um período crítico que facilita a ocorrência de alterações induzidas por novas experiências nessas células (GE et al., 2007). Cabe ressaltar que, apesar de esse processo ter sido estudado mais intensamente em camundongos, sua duração pode sofrer variações espécie-específicas (SNYDER et al., 2009).

Figura 6. Desenvolvimento de células-tronco em neurônios maduros na camada de células granulares do giro dentado hipocampal.



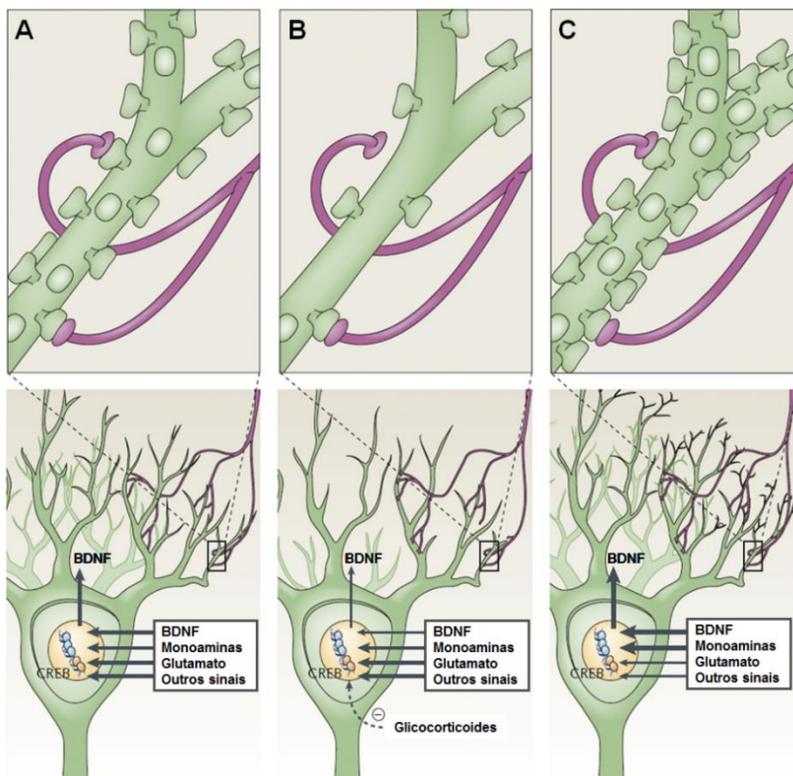
Legenda: Novos neurônios crescem a partir de duas populações de células progenitoras neurais, as células tipo 1 (T1, de divisão lenta) e as células tipo 2 (T2, amplificadoras transitórias). Durante o processo neurogênico, as células T1 dão origem às do tipo T2, as quais se diferenciam em neurônios, lentamente desenvolvendo arborizações dendríticas e projeções axonais. Entre a 2ª e a 3ª semana de idade, os novos neurônios começam a estabelecer conexões excitatórias e, em torno da 4ª semana estão totalmente integrados na circuitaria local. *Fonte: Adaptado de Suh, Deng e Gage (2009).*

A baixa eficácia e o efeito tardio da terapia antidepressiva monoaminérgica levou a suposição de que, apesar de possuir um papel indireto na fisiopatologia da depressão, alterações nesse sistema não parecem ser determinantes para a sintomatologia associada a este transtorno (DUMAN; HENINGER; ERIC, 1997; NESTLER et al., 2002). Sendo assim, as pesquisas na área foram gradativamente sendo redirecionadas para a hipótese neurotrófica da depressão, a qual postula que esse transtorno pode ser explicado (pelo menos em parte) por uma falha na neurogênese hipocampal adulta (KEMPERMANN; KRONENBERG, 2003). Essa ideia é baseada na observação de que a atrofia estrutural (redução no volume, perda neuronal e atrofia dendrítica) que os pacientes depressivos apresentam no hipocampo pode ser revertida durante a fase de remissão dos sintomas após tratamento crônico com antidepressivos

convencionais (FRODL et al., 2002; SHELINE, 2000). Além disso, os efeitos deletérios do estresse sobre o número de ramificações dendríticas, particularmente em neurônios da região CA3 do hipocampo, podem ser suprimidos pelo aumento na neurogênese hipocampal induzido por antidepressivos (DUMAN, 2009; REAGAN; MCEWEN, 1997; SANTARELLI et al., 2003; WOOLLEY; GOULD; MCEWEN, 1990).

Nesse contexto, segundo a hipótese neurotrófica da depressão, as alterações estruturais observadas em pacientes depressivos estão possivelmente relacionadas a uma neurogênese hipocampal prejudicada (JACOBS; VAN PRAAG; GAGE, 2000; SAHAY; HEN, 2007), um fenômeno atribuído a queda no suporte trófico, uma vez que fatores neurotróficos e de crescimento possuem um papel crítico na regulação da sobrevivência, diferenciação e funcionamento de novos neurônios no hipocampo (CASTRÉN; VÕIKAR; RANTAMÄKI, 2007; HUANG; REICHARDT, 2001). Levando em conta o crescente número de evidências demonstrando uma correlação entre a redução nos níveis de BDNF e o transtorno depressivo, essa molécula se tornou o fator neurotrófico mais investigado na neurobiologia da depressão (KAREGE et al., 2005; KIM et al., 2007; SEN; DUMAN; SANACORA, 2008). Além do seu papel no crescimento e desenvolvimento neuronal, o BDNF está também intimamente relacionado com a plasticidade neural, estimulando o crescimento de dendritos e axônios e estabilizando contatos sinápticos (COHEN-CORY, 2002; HU; NIKOLAKOPOULOU; COHEN-CORY, 2005). Esse papel pode ser prejudicado na presença de estressores tanto agudos quanto crônicos, uma vez que o excesso de GCs pode interferir com mecanismos transcricionais que levam a expressão de BDNF, reduzindo a fosforilação do elemento de resposta ao AMPc (CREB). Cabe ressaltar que essa alteração pode ser revertida pelo tratamento antidepressivo como ilustra a Figura 7 (BERTON; NESTLER, 2006; DUMAN; HENINGER; ERIC, 1997; DUMAN, 2004). De fato, independente do mecanismo de ação primário implicado na atividade dos antidepressivos convencionais, todos eles compartilham um aumento na produção de BDNF hipocampal e cortical com o decorrer do tratamento crônico, o que contribui para o restabelecimento sináptico nesta estrutura (CASTRÉN; VÕIKAR; RANTAMÄKI, 2007).

Figura 7. Hipótese neurotrófica da depressão



Legenda: O painel A demonstra um neurônio piramidal hipocampal de um indivíduo em estado normal, sofrendo regulação por suas inervações glutamatérgicas, monoaminérgicas e de outros tipos neuronais, assim como pela presença de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O painel B ilustra um neurônio piramidal hipocampal exposto a estresse severo com redução nos níveis de BDNF e ocorrência de atrofia dendrítica. Essa redução na expressão de BDNF é, pelo menos em parte, mediada pelo excesso de glicocorticoides interferindo com mecanismos transcricionais mediados pelo elemento de resposta ao AMPc (CREB). No painel C é representada a reversão desse quadro pelo tratamento antidepressivo, o qual leva a uma redução na excitotoxicidade glutamatérgica, assim como um aumento na atividade monoaminérgica, expressão de BDNF e arborização dendrítica dos neurônios hipocampais. *Fonte: Adaptado de Berton e Nestler (2006).*

Além do BDNF, recentemente outros mediadores tróficos têm sido foco de investigação na neurobiologia da depressão incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2007), fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) (ELSAIED et al., 2012) e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (PASLAKIS; BLUM; DEUSCHLE, 2012). O envolvimento de outros fatores tróficos sugere que a resposta comportamental à atividade antidepressiva provavelmente está correlacionada com alterações ocorridas em circuitarias neurais envolvidas com a modulação do humor, podendo ser mediada não apenas pelo BDNF, como também pela ativação de outras vias capazes de modular a neuroplasticidade. É importante mencionar que, apesar de existirem estudos demonstrando que o efeito dos fármacos antidepressivos convencionais depende da ocorrência da neurogênese (SANTARELLI et al., 2003), existem evidências de que apenas o remodelamento sináptico e arborização dendrítica são suficientes para a ocorrência desse efeito (BESSA et al., 2009). Nesse caso, mesmo que a neurogênese tenha um papel importante nos efeitos benéficos dos antidepressivos, ela não é um fator central sem o qual estes não ocorreriam, podendo existir aspectos da atividade antidepressiva tanto neurogênese-dependentes quanto independentes (GORMAN; DOCHERTY, 2010; SAHAY; HEN, 2007).

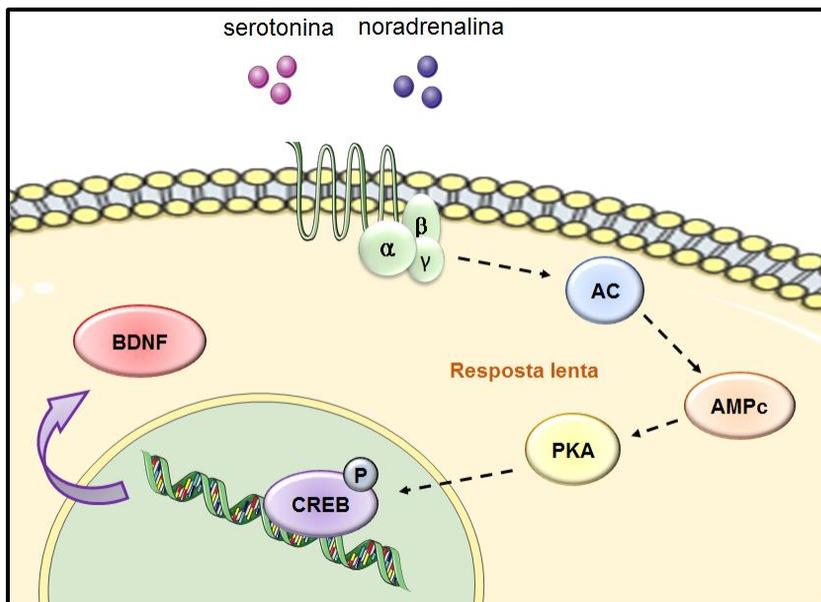
1.1.9. Vias de sinalização intracelular envolvidas na depressão

Com o acúmulo de informações acerca dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na depressão e seu tratamento, a ideia de explicar o transtorno como um desequilíbrio na atividade de neurotransmissores se tornou uma teoria, na melhor das hipóteses, incompleta. Levando em conta o efeito tardio da terapia antidepressiva convencional, passou-se a buscar estratégias terapêuticas que permitam uma forma mais rápida e eficaz de ocasionar alterações neurotróficas nos pacientes. Uma vez que, após a ligação a seus receptores específicos os neurotransmissores ativam uma série de cascatas de sinalização intracelular, interferir nesses mensageiros tem se constituído em um atraente alvo para o desenvolvimento de terapias mais eficientes e com menos efeitos colaterais (NICIU et al., 2013a).

A ativação de receptores serotoninérgicos e noradrenérgicos acoplados à proteína G estimulatória (a qual é composta pela subunidade alfa e pelo dímero beta/gama), causa uma alteração conformacional na subunidade alfa, fazendo com que esta se dissocie do dímero beta/gama e ative efetores downstream. A partir daí, ocorre a estimulação da adenilil ciclase, aumento nos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC)

e consequente estimulação da proteína cinase A (PKA). Uma vez ativada, a subunidade catalítica da PKA desloca-se para o núcleo por difusão passiva, onde fosforila CREB, um importante fator de transcrição para a produção de fatores neurotróficos, merecendo destaque o BDNF, como demonstra a Figura 8 (NIBUYA; NESTLER; DUMAN, 1996).

Figura 8. Sinalização intracelular envolvida no efeito de antidepressivos monoaminérgicos



Legenda: O tratamento com antidepressivos convencionais leva a um aumento de monoaminas na fenda sináptica as quais, através da ligação a receptores acoplados à proteína G estimulatória ocasionam a ativação da adenilil ciclase (AC) e aumento nos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Essa resposta estimula a proteína cinase A (PKA), cuja subunidade catalítica desloca-se para o núcleo fosforilando o elemento de resposta ao AMPc (CREB). Uma vez fosforilado, esse fator de transcrição promove a transcrição gênica de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Essa transcrição requer tratamento crônico para fazer efeito, pois é dependente de neuromoduladores de resposta lenta. *Fonte: Produzida pelo autor com permissão de Servier Medical Art (www.servier.com).*

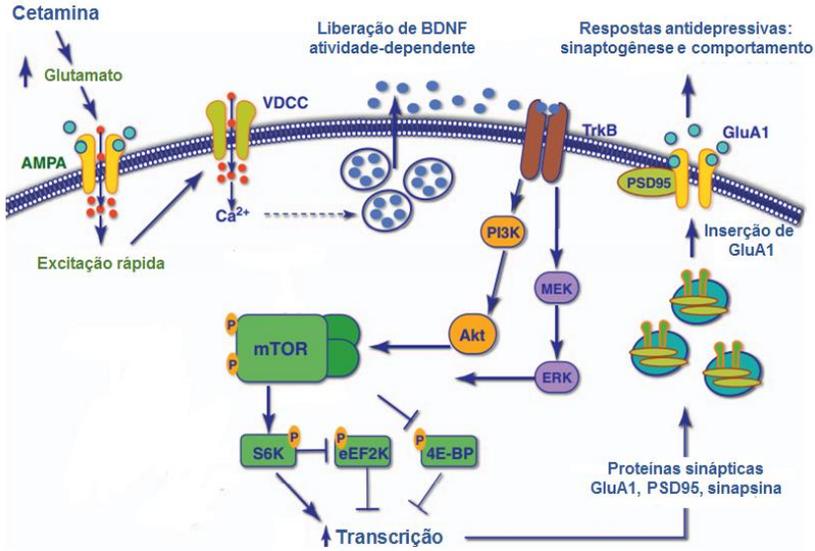
Levando em conta essa resposta lenta, o uso de estratégias moleculares capazes de interferir de forma mais direta nessa sinalização superaria muitas das desvantagens da terapia antidepressiva convencional (CONTI et al., 2002; NIBUYA; NESTLER; DUMAN, 1996). Outra alternativa, é a modulação de sistemas de neurotransmissão capazes de ativar mecanismos de sinalização intracelular distintos, cujo efeito sobre a transcrição de BDNF seja significativamente mais rápido (como por exemplo os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA) (JOURDI et al., 2009; ZHOU et al., 2013).

Os mecanismos que controlam a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular são controlados pela atividade das vias de sinalização da fosfatidilinositol 3-fosfato cinase (PI3K)/Akt e das proteína-cinase ativadas por mitógenos (MAPKs) (MENDOZA; ER; BLENIS, 2011). Essas vias são ativadas pela ligação de fatores de crescimento a seus receptores específicos e têm sido implicadas na fisiopatologia do transtorno depressivo maior. Nesse contexto, foi observado que o funcionamento dessa sinalização apresenta-se prejudicado durante a presença dos sintomas depressivos, podendo ser normalizado com o tratamento antidepressivo (DUMAN; MONTEGGIA, 2006; DWIVEDI et al., 2001; QI et al., 2009). Evidências experimentais sugerem que a liberação de BDNF, ocasionando a estimulação de seus receptores tropomiosina cinase B (TrkB) e consequente ativação das vias da PI3K/Akt e das MAPKs, parece ser um componente crucial para a ocorrência de uma resposta antidepressiva rápida e eficaz (AUTRY et al., 2011; DUMAN; VOLETI, 2012). De fato, foi observado tanto em modelos animais quanto em pacientes humanos que, a presença de uma mutação específica no gene que codifica o BDNF impede a ocorrência da resposta antidepressiva ocasionada pelo antidepressivo de efeito rápido cetamina (LAJE et al., 2012; LIU et al., 2012). A importância dessas vias para a resposta antidepressiva está diretamente relacionada com a ativação de alvos *downstream* que estimulam a síntese de proteínas sinápticas, um fenômeno que desempenha um papel importante na reversão da atrofia neuronal e redução da densidade sináptica observados no córtex pré-frontal e hipocampo de pacientes depressivos (KRISHNAN; NESTLER, 2010; PITTENGER; DUMAN, 2008).

A investigação dos mecanismos envolvidos na resposta antidepressiva desencadeada pela cetamina se tornou a base para a compreensão dos mecanismos moleculares que levam a sinaptogênese e remissão dos sintomas depressivos em um curto período de tempo. Sendo assim, foi constatado que a ativação de receptores AMPA induzida por esse agente farmacológico, leva a estimulação de canais de Ca^{2+} dependentes de

voltagem e consequente aumento rápido nos níveis de BDNF, o qual através da sinalização via PI3K e/ou MAPKs, é capaz de estimular a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), uma proteína-quinase que possui um papel crítico na regulação da síntese de proteínas sinápticas. Uma vez ativada, a mTOR age em outros alvos *downstream* a essa proteína, os quais são essenciais para a síntese proteica, tais quais a estimulação da proteína ribossomal S6 cinase (S6K) e a inibição da atividade de proteínas que possuem um papel inibitório sobre a síntese proteica tais quais a proteína de ligação ao fator de iniciação 4E em eucariotos (4E-BP) e a cinase do fator de alongação 2 (eEF2K) (DWYER; DUMAN, 2013; KRYSTAL; SANACORA; DUMAN, 2013; MACHADO-VIEIRA et al., 2009). Sendo assim, como demonstra a Figura 9, fatores de crescimento como o BDNF, através da ativação da mTOR, ativam cascatas de sinalização que culminam na transdução de proteínas diretamente envolvidas com a sinaptogênese, como a proteína de densidade pós-sináptica de 95 kDa (PSD-95), a subunidade GluA1 dos receptores glutamatérgicos tipo AMPA e a proteína sinapsina 1 (LI et al., 2011; ZHOU et al., 2013).

Figura 9. Vias de sinalização implicadas na resposta antidepressiva rápida



Legenda: Antidepressivos de ação rápida como a cetamina levam a um aumento nas concentrações extracelulares de glutamato. Isso faz com que ocorra a estimulação de receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VDCC), com consequente liberação atividade-dependente de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A estimulação dos receptores tropomiosina cinase B (TrkB) pelo BDNF leva a ativação das vias de sinalização da fosfatidilinositol 3-fosfato cinase (PI3K)/Akt e das proteína-cinase ativadas por mitógenos (MAPKs) como a proteína cinase ativada por mitógenos ativadora de ERK (MEK) e a cinase regulada por sinal extracelular (ERK). Essas vias, por sua vez, estimulam a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), a qual fosforila a S6 cinase (S6K) e inibe proteínas que possuem papel inibitório sobre a transcrição, tais quais a cinase do fator de alongação 2 (eEF2K) e a proteína de ligação ao fator de iniciação 4E em eucariotos (4E-BP). Esses eventos causam um aumento na expressão de proteínas sinápticas como a proteína de densidade pós-sináptica de 95KDa (PSD-95), GluA1 e sinapsina 1. Os receptores AMPA contendo a subunidade GluA1 sintetizada são subsequentemente inseridos na membrana, contribuindo para a sinaptogênese. *Fonte: Adaptado de Duman e Voleti (2012).*

1.1.10. Modelos animais de depressão

Modelos animais de depressão têm sido amplamente utilizados para investigar novos agentes com potencial terapêutico ou para identificar alvos moleculares envolvidos no efeito de determinados compostos (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Levando em conta que aspectos como culpa, ideação suicida e alterações no humor não podem ser mensurados em roedores, esses modelos buscam replicar em animais de laboratório endofenótipos específicos associados a essa doença. Nesse caso, busca-se avaliar aspectos isolados do transtorno tais quais o desamparo, anedonia, desespero comportamental, sintomas neurovegetativos e alterações bioquímicas e/ou morfológicas em determinadas regiões encefálicas dos animais (HASLER et al., 2004). Atualmente os modelos animais de depressão são avaliados conforme três critérios principais, os quais são utilizados para comparar os modelos entre si: i) validade de face (requer um nível razoável de homologia sintomática), ii) validade de constructo ou etiológica (fatores causais similares) e iii) validade preditiva ou farmacológica (reversão dos sintomas depressivos por antidepressivos convencionais) (NESTLER; HYMAN, 2010). A maior parte dos modelos animais de depressão são baseados na resposta que estes apresentam a administração de antidepressivos clássicos ou a resposta que os animais apresentam a protocolos de estresse (NESTLER et al., 2002).

O uso de modelos etológicos de depressão baseados na existência de um estressor ambiental teve início em meados dos anos 70, com a observação de que a exposição de animais a estímulos aversivos imprevisíveis resulta em uma redução nas tentativas de escapar de novos estressores, um fenômeno que foi chamado de desamparo aprendido (SELIGMAN; BEAGLEY, 1975; SELIGMAN; ROSELLINI; KOZAK, 1975). Posteriormente, foi constatado que a administração de fármacos antidepressivos é capaz de reverter essa alteração comportamental (LESHNER et al., 1979; PETTY; SHERMAN, 1979). Aproximadamente na mesma época, o teste do nado forçado (TNF) foi proposto como uma variação do desamparo aprendido, no qual animais submetidos a uma situação inescapável de exposição ao ambiente aquático, adquirem uma postura de imobilidade que é prevenida pela administração de fármacos ou intervenções antidepressivas clinicamente efetivas (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977). Esse teste se tornou o mais utilizado na investigação de compostos e mecanismos de atividade antidepressiva (YAN et al., 2010). Além disso, o teste de suspensão pela cauda (TSC) foi proposto em seguida como uma variante do TNF, no qual o mesmo princípio é aplicado, mas neste caso mediante a situação de suspensão de camundongos pela cauda (STERU et al., 1985). O fato de o TNF e o TSC serem sensíveis a um

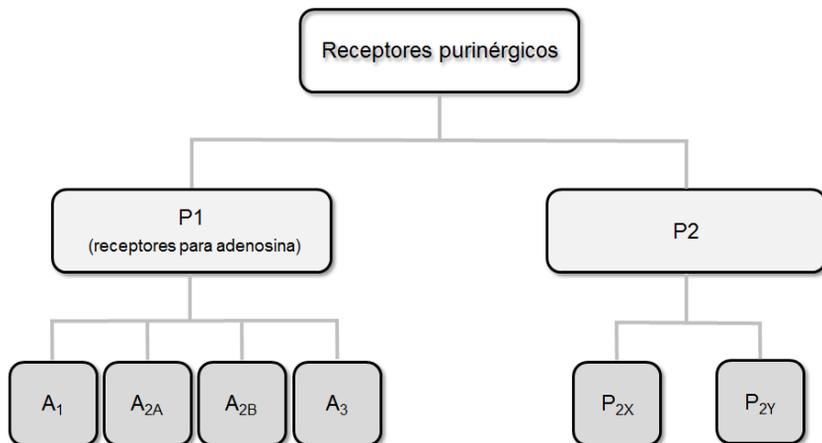
grande número de intervenções tanto farmacológicas quanto não-farmacológicas, fez com que ambos os testes obtivessem uma grande popularidade como modelos experimentais para a investigação de novos alvos terapêuticos e seus mecanismos associados. Além disso, esses testes também são sensíveis a diversos fatores capazes de desencadear o transtorno depressivo em humanos tais quais predisposição genética e exposição ao estresse (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Nesse contexto, protocolos de estresse agudo e crônico têm sido propostos como uma ferramenta para induzir um comportamento de desamparo (aumento no tempo de imobilidade nestes testes) que possa ser prevenido pela administração de antidepressivos em testes comportamentais (MCARTHUR; BORSINI, 2006). Entre esses, o modelo do estresse crônico imprevisível (ECI) foi proposto como uma estratégia capaz de impedir que os animais se adaptem aos estímulos estressores, desencadeando alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroendócrinas que só podem ser revertidas mediante tratamento repetido com antidepressivos convencionais (KATZ; ROTH; CARROLL, 1981; WILLNER, 1997; WILLNER et al., 1987). Adicionalmente, outros modelos têm sido apresentados como alternativas capazes de induzir alterações no comportamento de roedores em testes preditivos como o TNF e o TSC. Entre as abordagens utilizadas para induzir um comportamento tipo-depressivo nesses testes estão a exposição aguda a situações que causam um estresse de intensidade significativa (ex: o estresse de contenção agudo) (POLESZAK et al., 2006) e a administração de compostos capazes de alterar a neuroquímica cerebral de forma semelhante a depressão tais quais citocinas pró-inflamatórias (KASTER et al., 2012), endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS) (YIRMIYA, 1996) e glicocorticoides como a corticosterona (que simulam uma situação de exposição dos roedores a agentes estressores) (KALYNCHUK et al., 2004).

1.2. Guanosina

1.2.1. Sistema purinérgico

Nucleotídeos e nucleosídeos do sistema purinérgico são constituintes essenciais de todas as células vivas, desempenhando um papel sinalizador tanto intra quanto extracelularmente em diversos processos fisiológicos (DUNWIDDIE; MASINO, 2001). O conceito de sinalização purinérgica foi primeiramente proposto por Burnstock em 1972, o qual sugeriu que o ATP pode agir como neurotransmissor (BURNSTOCK, 1972), uma ideia que gerou críticas e controvérsia, uma vez que o papel

energético dessa molécula em vias bioquímicas já estava bem estabelecido. Estudos subsequentes levaram à descoberta de diversos receptores transmembrana para o sistema purinérgico, os quais foram categorizados em dois grupos maiores de acordo com seus ligantes. Sendo assim, foi estabelecido que os receptores do tipo P1 têm o nucleosídeo adenosina como ligante, ao passo que os receptores P2 podem ter como ligante o ATP ou adenosina 5'-difosfato (ADP) (BURNSTOCK, 1978). Conforme esquematizado na Figura 10, a posterior elucidação de suas propriedades estruturais e biológicas permitiu a criação de uma categorização mais precisa na qual a família de receptores P2X reconhece apenas ATP e age modulando a atividade de canais iônicos, ao passo em que a P2Y é uma família de receptores acoplados à proteína G que podem ligar tanto ATP quanto diversos outros nucleotídeos, desencadeando uma cascata de sinalização (JACOBSON et al., 2012; JARVIS; KHAKH, 2009). A família de receptores P1 é também composta por receptores metabotrópicos, sendo que os subtipos A₁ e A_{2A} possuem um papel importante na regulação da atividade neuronal, ao passo em que os subtipos A_{2B} e A₃ estão envolvidos principalmente com processos como resposta imunológica e inflamação (DUNWIDDIE; MASINO, 2001; HASKÓ; CRONSTEIN, 2004). Atualmente, sabe-se que essas famílias de receptores purinérgicos (P1, P2X e P2Y), incluem diversos sub-tipos de receptores, muitos dos quais podem formar homomultímeros e heteromultímeros. Esses receptores são amplamente distribuídos no SNC, participando da transmissão sináptica e mediando interações neurônio-glia e glia-glia (BURNSTOCK, 2008).

Figura 10. Famílias de receptores purinérgicos

Legenda: Os receptores purinérgicos são categorizados em dois grandes grupos, sendo que o P1 possui a adenosina como ligante ao passo que o P2 pode ter diversos nucleotídeos purinérgicos como ligantes. O grupo de receptores P1 é subcategorizado nos receptores A₁ A_{2A} A_{2B} e A₃, enquanto o grupo de receptores P2 se divide em duas novas categorias contendo diversos sub-tipos de receptores (famílias P2X e P2Y). *Fonte: Autor.*

O nucleosídeo purinérgico adenosina encontra-se presente em baixas concentrações no espaço extracelular, as quais podem ser dramaticamente elevadas na presença de alterações metabólicas tais quais as que ocorrem após episódios de isquemia, hipóxia, inflamação e trauma (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004; LINDEN, 2001). Na presença de estímulos fisiológicos, a adenosina pode ser formada intracelularmente a partir da degradação de adenosina monofosfato (AMP) e ser diretamente liberada dos neurônios através de transportadores de nucleosídeos (LATINI; PEDATA, 2001; LOVATT et al., 2012), exercendo um papel importante como neuromodulador (BOISON, 2008; CUNHA, 2001). Entretanto, em condições de estresse metabólico, a concentração extracelular de adenosina é derivada principalmente do metabolismo do ATP extracelular, o qual é degradado por uma sequência de reações mediadas pela atividade de enzimas ectonucleotidasas (LATINI; PEDATA, 2001; YEGUTKIN, 2008). Considerando as funções neuromoduladoras e citoprotetoras desse nucleosídeo, o sistema adenosinérgico tem sido investigado como alvo terapêutico para uma ampla variedade de condições patológicas tais quais

doenças cardiovasculares e inflamatórias, câncer e neuropatologias (BOISON, 2008; JACOBSON; GAO, 2006).

Até hoje, a pesquisa do sistema purinérgico tem se focado primariamente em derivados da adenina, ao passo em que os derivados da guanina (DG) têm recebido menos atenção. Os DG abrangem os nucleotídeos guanosina 5'-trifosfato (GTP), guanosina 5'-difosfato (GDP) e guanosina 5'-monofosfato (GMP), os quais podem ser extracelularmente metabolizados em guanosina pela ação de ectonucleotidasas. Esse nucleosídeo, por sua vez, pode ser convertido em guanina através da atividade da enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP). Embora os papéis do GTP e GDP como moduladores de cascatas de sinalização intracelular através da proteína G estejam bem estabelecidos (JOHNSTON; SIDEROVSKI, 2007), estudos recentes têm destacado o fato de que os DG também possuem um importante papel extracelular, o qual é relevante tanto em condições fisiológicas quanto patológicas.

1.2.2. Papel dos nucleosídeos purinérgicos no encéfalo

A adenosina desempenha um papel crucial em tecidos excitáveis como o coração e o cérebro devido a suas propriedades inibitórias na liberação de praticamente todos os neurotransmissores clássicos (DUNWIDDIE; MASINO, 2001). Sendo assim, tem sido proposto que esse nucleosídeo age como um regulador da atividade neural, através da ativação direta de receptores adenosinérgicos e mediação da atividade de outros neurotransmissores/neuromoduladores (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2000). Como mencionado anteriormente, a adenosina se liga aos membros da família P1 de receptores purinérgicos, os quais são acoplados à proteína G (BURNSTOCK, 2007). Apesar de existirem quatro tipos de receptores para adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3), os mais prevalentes no encéfalo são os sub-tipos A_1 e A_{2A} , sendo a ativação dos receptores A_1 responsável pelos efeitos moduladores desse nucleosídeo em sinapses excitatórias (CUNHA, 2001). Cabe ressaltar que o fato de a adenosina ser um produto da hidrólise do ATP e essas duas moléculas comumente apresentarem efeitos opostos, permite a existência de um mecanismo de regulação homeostática (FIELDS; BURNSTOCK, 2006).

Levando em conta sua atividade na regulação da transmissão sináptica e, a observação de que os níveis extracelulares de adenosina encontram-se aumentados em condições de desequilíbrio energético, evidências experimentais têm demonstrado o papel neuroprotetor dessa molécula em condições caracterizadas por uma desregulação no metabolismo e excitabilidade neuronal, como a morte celular induzida por isquemia ou convulsões (FREDHOLM et al., 2005; LATINI; PEDATA,

2001). Além disso, diversos estudos têm proposto um papel para a adenosina nas doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, sugerindo que a manipulação dos receptores A_1 e A_{2A} , pode ser uma potencial estratégia para o tratamento farmacológico dessas condições neurológicas (ANGULO et al., 2003; GOMES et al., 2011; KASTER et al., 2004; RAMLACKHANSINGH et al., 2011).

A respeito dos DG, é bem conhecido o papel intracelular dos nucleotídeos da guanina em eventos de sinalização celular, através de receptores acoplados à proteína G. Essa função é de extrema importância, uma vez que esta é a maior família de receptores de membrana, estando envolvida na modulação da maioria das respostas celulares a hormônios e neurotransmissores (BOKOCH et al., 2010; LAGERSTRÖM; SCHIÖTH, 2008). Em contrapartida, o papel extracelular dos DG ainda está começando a ser compreendido. Uma parcela significativa do conhecimento que se tem atualmente sobre essa função se deve ao crescente número de evidências demonstrando que a guanosina parece ser uma importante molécula sinalizadora no meio extracelular, ativando alvos relacionados a uma resposta neuroprotetora e a efeitos tróficos (NEARY et al., 1996; RATHBONE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2015; SCHMIDT; LARA; SOUZA, 2007). A principal fonte de guanosina extracelular vem do catabolismo de nucleotídeos da guanina liberados pelos astrócitos (CICCARELLI et al., 1999, 2001). Nesse contexto, evidências experimentais sugerem que as concentrações extracelulares de guanosina são mais elevadas que as de adenosina, tanto em condições fisiológicas quanto em resposta a insultos (CICCARELLI et al., 1999). Além disso, ao passo em que a adenosina é rapidamente metabolizada em situação de isquemia, as concentrações de guanosina continuam a sofrer um aumento progressivo nesta condição, chegando a apresentar um aumento de 3,5 vezes em comparação aos níveis fisiológicos (CICCARELLI et al., 1999). Cabe ressaltar ainda que os níveis elevados desse nucleosídeo após dano isquêmico podem permanecer elevados durante um período de até 7 dias após a ocorrência do insulto (UEMURA et al., 1991). Sendo assim, esses achados indicando a presença prolongada de altos níveis de guanosina em condições patológicas, assim como seu papel trófico e neuroprotetor, sugerem que possivelmente a guanosina seja uma molécula neuroprotetora endógena liberada em situações de dano celular.

1.2.3. Efeitos neurotróficos da guanosina

Os efeitos neurotróficos da guanosina têm sido reportados em neurônios hipocâmpais, células da glia e células de feocrocitoma (PC12), onde essa molécula é capaz de induzir a proliferação e diferenciação

celular, crescimento e arborização de neuritos, assim como exercer efeitos anti-apoptóticos (CICCARELLI et al., 2001; DI IORIO et al., 2001; MIDDLEMISS; GYSBERS; RATHBONE, 1995; RATHBONE et al., 2008, 1999). Essas ações parecem ser mediadas pela capacidade que esse nucleosídeo tem de estimular a liberação astrocitária de diversos reguladores endógenos da sobrevivência, proliferação e diferenciação, incluindo fatores tróficos como o FGF-2, fator de crescimento do nervo (NGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF β) (CICCARELLI et al., 2001; MIDDLEMISS; GYSBERS; RATHBONE, 1995; RATHBONE et al., 2008). O aumento na liberação desses fatores pela guanosina está relacionado, em parte, com os efeitos modulatórios que essa molécula tem sobre a atividade dos astrócitos. Por exemplo, a guanosina é capaz de estimular a proliferação dessas células da glia (CICCARELLI et al., 2000; RATHBONE et al., 1991) e causar uma melhora na interação neurônio-astrócito, um efeito possivelmente mediado pela reorganização de componentes da matriz extracelular causado por esse nucleosídeo (DECKER et al., 2007).

Outro fator importante envolvido nos efeitos neurotróficos da guanosina, são as propriedades neuritogênicas que essa molécula apresenta (BAU et al., 2005; MIDDLEMISS; GYSBERS; RATHBONE, 1995). O processo neuritogênico tem um papel no desenvolvimento neural e é também uma característica da diferenciação neuronal e recuperação funcional, no qual neuritos iniciais podem se diferenciar em dendritos ou axônios (DE CURTIS, 2007; POLLEUX; SNIDER, 2010). Um modelo *in vitro* importante e amplamente utilizado para a investigação da diferenciação neuronal e crescimento de neuritos é a exposição de células PC12 ao NGF (GREENE; TISCHLER, 1976). Nesse contexto, foi demonstrado que a guanosina desencadeia efeitos neuritogênicos tanto através de mecanismos AMPc-dependentes (similares aos desencadeados pelo NGF), quanto através da ativação de vias de sinalização AMPc-independentes (GYSBERS; RATHBONE, 1996). Em estudo posterior foi evidenciado que esse mecanismo de transdução independente de AMPc possivelmente envolve a participação da modulação de vias que levam à indução da enzima HO-1 (BAU et al., 2005).

Levando em conta as propriedades neuritogênicas da guanosina, foi avaliado também se esse nucleosídeo é capaz de promover a maturação neuronal em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) (GUARNIERI et al., 2009). A análise do perfil genético dessas células expostas à guanosina revelou que esse nucleosídeo é capaz de induzir o bloqueio do ciclo celular na fase S e ocasionar um efeito neuritogênico comparável ao exercido por diversos compostos conhecidos por serem indutores eficazes

da diferenciação neuronal como o ácido retinoico e o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Além disso, esse estudo também observou que os efeitos neuritogênicos da guanosina estão associados com a modulação de marcadores de diferenciação neuronal, sugerindo que esse nucleosídeo possivelmente desempenha um papel nesse estágio do processo neurogênico durante o desenvolvimento e/ou eventos patológicos (GUARNIERI et al., 2009).

1.2.4. O papel da guanosina na transmissão glutamatérgica

A capacidade da guanosina de estimular a captação de glutamato pelos astrócitos foi confirmada por diversos estudos (DAL-CIM et al., 2013; FRIZZO et al., 2003, 2005; SOARES et al., 2004). Uma vez que esse efeito parece ocorrer particularmente na presença de concentrações elevadas desse neurotransmissor, é possível que seja dependente de um desequilíbrio entre a liberação de glutamato e a capacidade dos astrócitos de removê-lo da fenda sináptica. Essa observação reforça a ideia de que possivelmente a guanosina tenha um papel neuroprotetor em resposta a situações de insulto no SNC (FRIZZO et al., 2005). Considerando que a redução na expressão e atividade dos transportadores de glutamato astrocitários é uma característica da patogênese e progressão de diversas neuropatologias, compostos como a guanosina constituem alvos terapêuticos promissores (SEIFERT; SCHILLING; STEINHÄUSER, 2006; SHELDON; ROBINSON, 2007; TILLEUX; HERMANS, 2007).

1.2.5. Metabolismo e vias de sinalização ativadas pela guanosina

Em comparação com a adenosina, os mecanismos biológicos envolvidos nas respostas neurotrófica e neuroprotetora da guanosina ainda não estão completamente compreendidos. Levando em conta o rápido metabolismo das purinas, vários estudos buscam determinar se as propriedades neuroprotetoras da guanosina podem de fato ser atribuídas a esse nucleosídeo e não a estimulação de algum efector humoral desconhecido ou metabólito desse nucleosídeo (GIULIANI et al., 2012a; JIANG et al., 2008a; SCHMIDT et al., 2010a; VINADÉ et al., 2004). Nesse contexto, foi observado que os níveis plasmáticos de guanosina aumentam de forma dose- e tempo-dependentes após administração intraperitoneal desse nucleosídeo (GIULIANI et al., 2012a), sendo que sua concentração encontra-se dobrada durante 90 min após tratamento com dose de 8 mg/kg (JIANG et al., 2008a). Além disso, as concentrações máximas de seus metabólitos (guanina, xantina e ácido úrico) no plasma foram detectadas 15-30 min após a administração de guanosina, indicando que esse nucleosídeo é rapidamente metabolizado após administração

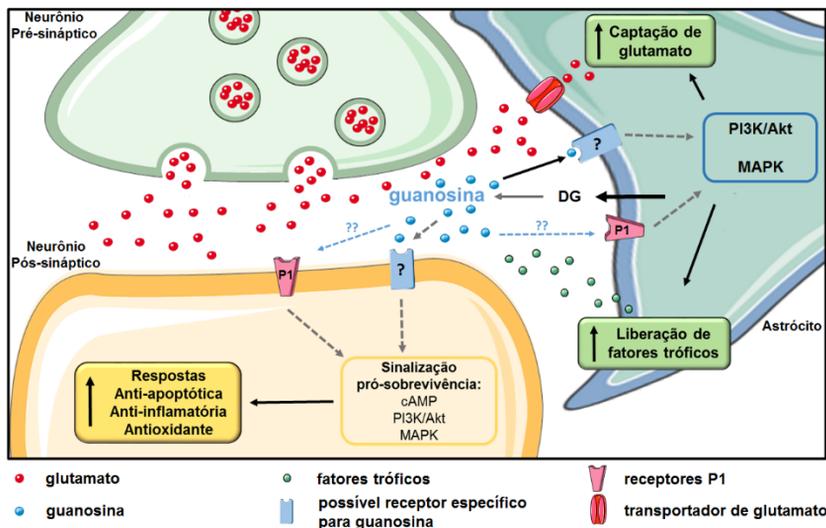
exógena. Cabe ressaltar ainda que a guanosina é amplamente distribuída nos tecidos corporais após administração sistêmica, sendo capaz de entrar no SNC em 7,5 min, onde suas concentrações continuam a crescer, atingindo um pico em torno de 30 min após administração intraperitoneal (GIULIANI et al., 2012a; JIANG et al., 2008a). Um padrão similar foi observado após administração por via oral, evidenciado pela observação de um aumento dose-dependente nas concentrações de guanosina e seus metabólitos no líquido cefalorraquidiano (SCHMIDT et al., 2010a; VINADE et al., 2005). Esses dados corroboram achados que demonstram que a guanosina é captada por transportadores de nucleosídeos (NAGASAWA et al., 2007; PENG et al., 2005), os quais podem ser encontrados em células intestinais, microvasos encefálicos e na barreira hematoencefálica (BHE) (JONES; HAMMOND, 1995; KALARIA; HARIK, 1988; PATIL; UNADKAT, 1997). É digno de nota que, evidências *in vitro* demonstram que a concentração de guanosina é reduzida em 50% na primeira hora após tratamento, mas seus metabólitos permanecem constantemente elevados por até 3 h. Sendo assim, possivelmente esse nucleosídeo apresenta uma meia-vida prolongada no meio extracelular (CICCARELLI et al., 2001).

Uma vez na fenda sináptica, a guanosina exerce efeitos biológicos sincronizando vias de sinalização intracelular distintas, as quais parecem estar relacionadas com a atividade de receptores PI (sub-tipos A₁ e A_{2A}), assim como com um sítio de ligação específico acoplado à proteína G (DAL-CIM et al., 2013; DI IORIO et al., 2001; THAUERER; ZUR NEDDEN; BAIER-BITTERLICH, 2012). Esse sítio de ligação se mostrou importante para a ocorrência dos efeitos neuroprotetores desencadeados por esse nucleosídeo, incluindo sua capacidade de estimular a captação de glutamato e a liberação de fatores tróficos pelos astrócitos (DAL-CIM et al., 2013; DI IORIO et al., 2001, 2004). Nesse contexto, a existência de um receptor de membrana acoplado à proteína G específico para guanosina tem sido proposta, o qual possivelmente estaria participando dos eventos de sinalização celular mediados por esse nucleosídeo (BAU et al., 2005; DI IORIO et al., 2004; THAUERER; ZUR NEDDEN; BAIER-BITTERLICH, 2012). Suportando essa hipótese, sítios de ligação para a guanosina, distintos dos já bem caracterizados receptores para adenosina e purinas, foram encontrados em preparados de membranas encefálicas de ratos (TRAVERSA et al., 2002, 2003; VOLPINI et al., 2011). Entretanto, uma vez que esse possível receptor para guanosina ainda não foi clonado, sua existência permanece alvo de controvérsia.

Diversas linhas de evidência têm sugerido que as vias de sinalização da PI3K/Akt e das MAPKs são importantes mediadores das

propriedades biológicas desencadeadas pela guanosina, incluindo sua capacidade de modular a transmissão glutamatérgica (DAL-CIM et al., 2013; QUINCOZES-SANTOS et al., 2013) e seus efeitos anti-apoptóticos (DI IORIO et al., 2004; PETTIFER et al., 2004), antioxidantes (DAL-CIM et al., 2012) e anti-inflamatórios (D'ALIMONTE et al., 2007) (Figura 11). Essas cascatas de sinalização intracelular podem ser direta ou indiretamente ativadas pela guanosina como parte de uma resposta a neuroinflamação e estresse oxidativo. Nesse contexto, tem sido demonstrado que esse nucleosídeo é capaz de prevenir a produção de EROs (DAL-CIM et al., 2012; HANSEL et al., 2014a) e neutralizar alterações em parâmetros inflamatórios, tais quais o aumento nos níveis de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α) e o decréscimo nos níveis da citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10) no córtex de ratos (HANSEL et al., 2014b). Além disso, a ativação das vias da PI3K/Akt e MAPKs induzida pela guanosina tem sido também relacionada com a inibição do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), assim como com a indução da expressão da enzima HO-1 (BAU et al., 2005; BELLAVAR et al., 2015; D'ALIMONTE et al., 2007; DAL-CIM et al., 2012, 2013).

Figura 11. Mecanismos envolvidos nos efeitos da guanosina



Legenda: Os astrócitos são a principal fonte de derivados da guanina (DG) no Sistema Nervoso Central. A guanosina presente no espaço extracelular tem origem no catabolismo de nucleotídeos da guanina por enzimas ectonucleotidasas, o qual sofre um aumento em situações de insulto. Diversas evidências experimentais suportam a noção de que o acúmulo de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e a ativação das vias de sinalização intracelular da fosfatidilinositol 3-fosfato cinase (PI3K)/Akt e das proteína-quinase ativadas por mitógeno (MAPKs) desempenham um papel importante na atividade biológica desse nucleosídeo. Essa sinalização parece estar relacionada com a ativação de um possível receptor específico para guanosina, mas sua existência ainda é alvo de debate. Além disso, a atividade dos receptores P1 também contribui para os efeitos desencadeados pela guanosina, embora a exata interação molecular envolvida nessa contribuição ainda seja desconhecida. A nível sináptico, a guanosina estimula a captação de glutamato pelos astrócitos, prevenindo a ocorrência de eventos excitotóxicos. Além disso, esse nucleosídeo também estimula a liberação astrocítica de fatores tróficos e ativa mecanismos neuroprotetores, incluindo respostas anti-apoptótica, anti-inflamatória e antioxidante. *Fonte: Produzida pelo autor com permissão de Servier Medical Art (www.servier.com).*

1.2.6. Efeitos da guanosina em neuropatologias

Levando em conta a ampla variedade de efeitos biológicos desencadeados pela guanosina, diversos estudos têm demonstrado os efeitos neuroprotetores dessa molécula contra insultos os quais incluem excitotoxinas (OLIVEIRA et al., 2004; SCHMIDT et al., 2000), apoptose induzida por estaurosporina (DI IORIO et al., 2004), prejuízo cognitivo induzido por sepsis (PETRONILHO et al., 2012), dano oxidativo induzido por azida (QUINCOZES-SANTOS et al., 2014), inflamação induzida por LPS (BELLAYER et al., 2015), dano isquêmico (CONNELL et al., 2013; FRIZZO et al., 2002; MORETTO et al., 2005), toxicidade induzida pelo peptídeo β -amiloide (PETTIFER et al., 2004; TAROZZI et al., 2010), assim como por 1-metil 4-fenil piridina (MPP+) e 6-hidroxi-dopamina (GIULIANI et al., 2012b, 2015; LI et al., 2014; PETTIFER et al., 2007) e lesão na medula espinhal (JIANG et al., 2007, 2008b). Sendo assim, esses estudos fornecem evidência de que a guanosina pode ser um alvo terapêutico para um amplo espectro de neuropatologias.

Uma das atividades biológicas mais estudadas da guanosina são seus efeitos protetores contra convulsões induzidas pela administração local ou sistêmica de compostos excitatórios endógenos, os quais são capazes de causar uma liberação excessiva de glutamato e prejudicar a captação astrocitária. Sendo assim, evidências indicam que a capacidade que esse nucleosídeo tem de estimular a captação de glutamato possui um papel relevante em seu efeito anticonvulsivante (LARA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; SCHMIDT et al., 2000; VINADÉ et al., 2003). Curiosamente, análises eletrofisiológicas sugerem que possivelmente esse efeito protetor da guanosina contra insulto excitotóxico apresenta menos efeitos adversos do que o exercido por antagonistas de receptores NMDA (TORRES et al., 2010).

A investigação dos efeitos protetores da guanosina contra insulto isquêmico também tem sido uma das principais linhas de investigação contribuindo para elucidar os mecanismos de ação dessa molécula (DALCIM et al., 2013; FRIZZO et al., 2002; HANSEL et al., 2014b; MORETTO et al., 2005; OLESKOVICZ et al., 2008). Esses estudos sugerem a ocorrência de alterações que envolvem a participação de receptores adenosinérgicos e um sítio de ligação específico acoplado a proteína G. Sendo assim, a modulação desses alvos desencadeada pela guanosina parece levar a sincronização de diferentes eventos sinalizadores, culminando na estimulação da captação de glutamato e redução na disfunção mitocondrial, produção de EROs e resposta inflamatória (DALCIM et al., 2011, 2013; OLESKOVICZ et al., 2008). Adicionalmente, a atividade neuroprotetora da guanosina contra isquemia é evidenciada *in*

vivo, onde o tratamento com esse nucleosídeo se mostra capaz de prolongar a sobrevivência de ratos submetidos a oclusão arterial, reduzindo significativamente os déficits neurológicos e o volume da lesão tecidual induzidos pelo dano isquêmico (CHANG et al., 2008; RATHBONE et al., 2011).

A guanosina é considerada também um alvo promissor para investigação em modelos de doenças neurodegenerativas, apresentando efeitos neuroprotetores em modelos experimentais *in vitro* da doença de Alzheimer e da doença de Parkinson. Esses efeitos parecem ser mediados pela estimulação das vias da PI3K/Akt e MAPKs, assim como pela consequente redução na disfunção mitocondrial (GIULIANI et al., 2012b, 2015; LI et al., 2014) e neutralização de processos inflamatórios, oxidativos e apoptóticos (D'ALIMONTE et al., 2007; PETTIFER et al., 2004, 2007; TAROZZI et al., 2010). É importante mencionar que a administração crônica de guanosina se mostrou capaz de desencadear uma melhora funcional em ratos submetidos a um modelo de parkinsonismo, a qual é acompanhada por uma redução na apoptose e aumento da neurogênese na ZSV (SU et al., 2009). Essa observação deu origem a uma investigação posterior confirmando que a guanosina é capaz de estimular a proliferação de células tronco neurais *in vitro* através da ativação de AMPc e CREB, levando a um consequente aumento nos níveis de BDNF (SU et al., 2013).

De fato, a guanosina é capaz de estimular processos regenerativos do SNC, como evidenciado por estudos utilizando modelos animais de lesão na medula espinhal. Nesse contexto, o tratamento crônico com esse nucleosídeo se mostrou capaz de ocasionar uma melhora sintomática em roedores, reduzindo parâmetros inflamatórios e apoptóticos (JIANG et al., 2007). As propriedades regenerativas da guanosina foram reforçadas pela observação experimental de que esse nucleosídeo desencadeia uma melhora funcional mesmo quando administrado 5 semanas após lesão na medula, ativando oligodendrócitos e estimulando a remielinização das fibras neurais (JIANG et al., 2003, 2008b).

Além dos efeitos acima mencionados, a guanosina tem sido alvo de diversos estudos investigando seus efeitos em modelos comportamentais. Uma vez que a transmissão glutamatérgica desempenha um papel importante na dor (CHIZH, 2002), esse nucleosídeo tem se mostrado um alvo promissor para o tratamento de quadros nociceptivos patológicos em modelos pré-clínicos (SCHMIDT et al., 2010a, 2008, 2009a, 2009b, 2010b). Entretanto, levando em conta o papel importante que o glutamato tem na modulação dos processos de aprendizado e memória (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003), é necessário investigar a

probabilidade de que altas doses de guanósina possam apresentar um efeito amnésico. Essa hipótese é sugerida por estudos comportamentais indicando que a guanósina prejudica a performance de ratos no modelo da esQUIVA inibitória, um paradigma experimental comumente utilizado para avaliar a memória de trabalho (ROESLER et al., 2000; VINADÉ et al., 2004). Em contrapartida, foi demonstrado que a administração crônica desse nucleosídeo não resulta em prejuízos no aprendizado e memória espaciais avaliados pelo labirinto aquático de Morris (GANZELLA et al., 2012). Sendo assim, novos estudos são necessários para esclarecer os efeitos da guanósina sobre o aprendizado e memória. É digno de nota que a administração de guanósina parece ser segura e não estar associada a efeitos adversos relevantes. Essa afirmação se origina da observação de que o tratamento crônico com esse nucleosídeo não causa alterações no peso e temperatura corporal, consumo alimentar ou atividade locomotora no teste do rotarod em camundongos (VINADÉ et al., 2003). Além disso, as doses comumente reportadas nos estudos investigando a atividade biológica da guanósina (em torno de 8 mg/kg) possivelmente não causam toxicidade, uma vez que o tratamento crônico com doses até 120 mg/kg não demonstra alterações significativas nos níveis de enzimas renais ou hepáticas em roedores (SCHMIDT et al., 2010a).

Por fim, é importante mencionar também que os mecanismos envolvidos na atividade biológica da guanósina possuem diversas similaridades com os implicados na ocorrência de atividade antidepressiva, tais quais a modulação da transmissão glutamatérgica, liberação de fatores tróficos e ativação das vias da PI3K/Akt e das MAPKs. Nesse contexto, foi demonstrado que esse nucleosídeo apresenta uma atividade tipo-antidepressiva no TNF e no TSC, a qual foi verificada através de sua administração aguda nas doses de 0,05 a 5 mg/kg e parece envolver a sinalização via PI3K/Akt/mTOR (BETTIO et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A depressão é um transtorno que apresenta alta prevalência e taxas de incapacitação (KESSLER et al., 2003, 2005; LOPEZ; MURRAY, 1998). Um dos motivos que agravam seu impacto social são os problemas que a terapia convencional atualmente disponível para o tratamento desse transtorno apresenta, tais quais uma grande quantidade de efeitos colaterais e um efeito tardio que prejudicam a adesão ao tratamento (COVINGTON; VIALOU; NESTLER, 2010). Levando em conta a alta demanda por alternativas terapêuticas para o manejo da depressão, estudos clínicos têm demonstrado que compostos capazes de modular o sistema glutamatérgico são um alvo promissor para uma nova classe de antidepressivos mais eficaz que a terapia convencional (HASHIMOTO, 2011; ZARATE JR. et al., 2006; ZARATE et al., 2004).

A guanosina é um nucleosídeo endógeno do sistema purinérgico que age em diversos mecanismos intimamente associados com a atividade antidepressiva tais quais a estimulação da captação do glutamato (FRIZZO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004), a síntese de fatores tróficos (RATHBONE et al., 2008) e a indução de uma resposta neuroprotetora, reduzindo eventos inflamatórios e processos oxidativos (DAL-CIM et al., 2013; HANSEL et al., 2014b; QUINCOZES-SANTOS et al., 2013; SU et al., 2009). Considerando que os efeitos biológicos da guanosina exibem uma grande similaridade com os mecanismos implicados na ocorrência da atividade antidepressiva, em estudo prévio o potencial antidepressivo da guanosina foi investigado em modelos animais preditivos (BETTIO et al., 2012).

O presente trabalho buscou aprofundar essa linha de investigação avaliando a atividade protetora desse nucleosídeo contra o dano oxidativo e comportamento tipo-depressivo induzidos pelo estresse. Além disso, apesar de a guanosina exercer uma série de efeitos neurotróficos, ainda não existem evidências acerca de seus efeitos sobre a neurogênese hipocampal. Para esclarecer essa questão, a influência da administração crônica de guanosina na proliferação celular e diferenciação neuronal no GD do hipocampo foi avaliada. Adicionalmente, levando em conta as diferenças nos mecanismos da ação antidepressiva de agentes farmacológicos de resposta lenta e resposta rápida, o presente trabalho realizou um estudo preliminar comparando a ação antidepressiva da guanosina com a exercida pela fluoxetina e pela cetamina frente ao prejuízo ocasionado por diferentes modelos de estresse crônico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a participação de mecanismos neuroprotetores e a influência da neurogênese hipocampal sobre a atividade tipo-antidepressiva da guanosina.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar se o pré-tratamento com guanosina exerce efeito protetor contra comportamento tipo-depressivo e estresse oxidativo hipocampal induzidos pelo modelo de estresse de contenção (EC);
- Avaliar as alterações na atividade de enzimas antioxidantes endógenas no hipocampo de animais submetidos ao EC e o papel da guanosina frente a essas possíveis alterações;
- Investigar o efeito tipo-antidepressivo do tratamento crônico com guanosina;
- Verificar os efeitos da administração crônica de guanosina sobre a proliferação celular e diferenciação neuronal no GD do hipocampo;
- Realizar estudo comparativo do efeito tipo-antidepressivo da guanosina, fluoxetina e cetamina frente aos modelos de ECI e de depressão induzida por corticosterona.

CAPÍTULO 1 – GUANOSINA PREVINE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E DANO OXIDATIVO INDUZIDOS PELO ESTRESSE DE CONTENÇÃO AGUDO

Experiências de vida estressoras são reconhecidas como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de depressão, uma vez que interferem com mecanismos de neuroplasticidade levando a uma atrofia neuronal e sináptica (PITTENGER; DUMAN, 2008). Nesse contexto, devido aos altos níveis de receptores para GCs no hipocampo, essa região encefálica é particularmente vulnerável aos efeitos do estresse (MCEWEN, 2000). A exposição aguda a eventos estressores e o consequente aumento nos níveis de GCs circulantes induz uma rápida liberação de glutamato em regiões corticais e límbicas (LOWY; WITTENBERG; YAMAMOTO, 1995; MUSAZZI et al., 2010), a qual em altos níveis está relacionada com a ocorrência de eventos deletérios para os neurônios tais quais a disfunção mitocondrial e geração excessiva de EROs (HARDINGHAM; FUKUNAGA; BADING, 2002; REYNOLDS; HASTINGS, 1995).

Uma vez que existem evidências de que a regulação do estresse oxidativo é um dos mecanismos pelos quais os antidepressivos utilizados atualmente na prática clínica exercem seus efeitos (HERKEN et al., 2007; KHANZODE et al., 2003; KOTAN et al., 2011), novos alvos terapêuticos têm sido considerados para investigação baseado em suas propriedades antioxidantes (LEE et al., 2013). Considerando que existem evidências de que um dos mecanismos pelos quais a guanosina exerce efeito neuroprotetor em situações de insulto é através da regulação dos parâmetros oxidativos (DAL-CIM et al., 2013; QUINCOZES-SANTOS et al., 2013; TAROZZI et al., 2010), o presente estudo investigou os efeitos protetores desse nucleosídeo sobre as alterações comportamentais induzidas pela exposição ao EC agudo assim como no desequilíbrio nos parâmetros oxidantes/antioxidantes que a exposição a esse modelo ocasiona (FREITAS et al., 2014; KUMAR; GARG; PRAKASH, 2010; MORETTI et al., 2013).

1. Materiais e métodos

1.1. Animais

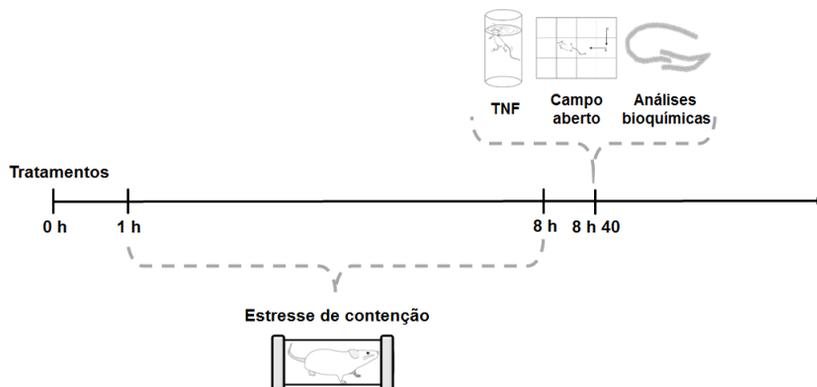
Camundongos Swiss fêmeas (pesando entre 35-45 g; aproximadamente 60 dias de idade), mantidos a 20-22 °C com livre acesso a água e comida e submetidos a um ciclo claro/escuro 12:12 horas (luzes acesas às 7:00) foram utilizados ($n=7-10$). Os animais foram acomodados

em grupos de 15 por caixa (41x34x16 cm). Todos os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 horas sendo que, os animais foram aclimatizados na sala de experimentação 24 horas antes dos testes comportamentais. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° 00795).

1.2. Estresse agudo de contenção (EC)

O protocolo de EC foi realizado conforme descrito previamente (FREITAS et al., 2014; MORETTI et al., 2013). Os animais foram tratados com veículo, guanosina ou fluoxetina e, 1 h após o tratamento, imobilizados durante um período de 7 hs mediante dispositivos individuais feitos de Plexiglas fenestrado, restringindo qualquer movimento físico sem causar dor. Os animais foram privados de comida e água durante todo o período de exposição ao estresse. O grupo controle foi tratado com veículo ou guanosina e mantido sem água e comida por 7 hs (tempo de duração do estresse). Após esse tempo, o grupo estressado foi liberado dos compartimentos e, 40 min depois, ambos os grupos foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF), ao teste do campo aberto e em seguida eutanasiados por decapitação para retirada das amostras de hipocampo e posterior análises bioquímicas (Figura 1).

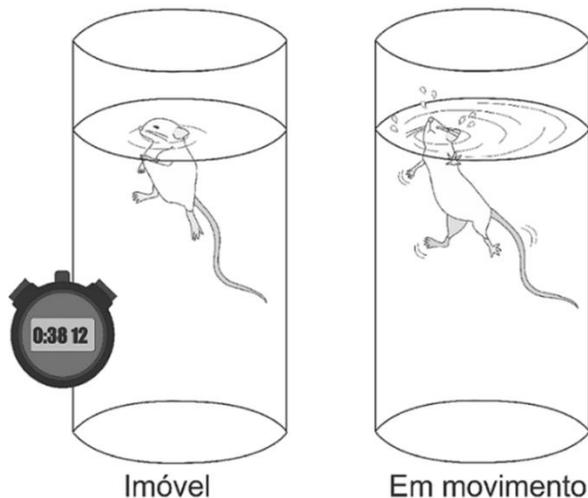
Figura 1. Cronograma dos procedimentos experimentais



Legenda: Guanosina (5 mg/kg, p.o.), fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) ou veículo foram administrados 1 h antes da exposição dos animais ao estresse de contenção (EC). Os animais foram então imobilizados durante um período de 7 h. Decorridos 40 min do término do EC, foram realizados o teste do nado forçado (TNF) e o teste do campo aberto, sendo em seguida rapidamente feita a coleta dos hipocampus e processamento tecidual para análise bioquímica.

1.3. Teste do nado forçado (TNF)

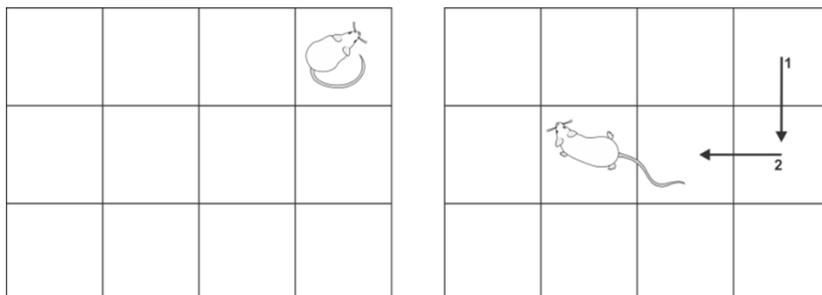
O TNF é um dos modelos comportamentais mais utilizados para detectar a atividade antidepressiva de compostos e fármacos. O método original foi descrito por PORSOLT; BERTIN; JALFRE (1977) e baseia-se na observação de que, quando os animais são submetidos a uma situação onde não há possibilidade de escape, após um período de agitação inicial adotam uma postura de imobilidade. O camundongo é considerado imóvel quando flutua ou faz apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. 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, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 minutos (Figura 2). Uma redução no tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle é um indicativo de atividade antidepressiva e, um aumento no tempo de imobilidade é associado a um estado tipo-depressivo (MORETTI et al., 2013; PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

Figura 2. Teste do nado forçado (TNF)

Legenda: O teste do nado forçado (TNF) é um dos testes preditivos mais utilizados para avaliação de atividade antidepressiva. O modelo consiste em submeter os camundongos a uma situação inescapável durante 6 minutos, sendo que após agitação inicial os animais desenvolvem uma postura de imobilidade. Uma redução nesse tempo em comparação ao grupo controle é interpretada como um aumento na forma ativa de lidar com uma situação estressante. Animais submetidos a esse teste apresentam uma redução no tempo de imobilidade quando tratados com compostos que possuem atividade antidepressiva. *Fonte: Autor.*

1.4. Teste do campo aberto

A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição ou aumento no tempo de imobilidade no TNF seja devido a uma alteração motora, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto durante 6 minutos (RODRIGUES et al., 2002). Este teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, com a base dividida em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados com as quatro patas foi o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora (Figura 3). A base da caixa de madeira foi limpa com álcool (10%) entre os testes sendo estes realizados em uma sala com temperatura controlada.

Figura 3. Teste do campo aberto

Legenda: A fim de descartar a possibilidade de que interferências na atividade locomotora possam levar a resultados falso-positivos, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto no qual o número de quadrantes cruzados pelos camundongos (como exemplificado pelos números 1 e 2) durante um período de 6 minutos foi mensurado. *Fonte: Autor.*

1.5. Agentes farmacológicos e tratamento

Guanosina e fluoxetina (obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foram dissolvidos em água destilada e administrados por via oral em doses de 5 e 10 mg/kg, respectivamente, 1 h antes do EC. As doses foram escolhidas baseado em estudos prévios (BETTIO et al., 2012; MORETTI et al., 2012). As soluções foram preparadas e em seguida administradas em um volume de 10 ml/kg. Os grupos controle receberam o mesmo tratamento, originando os seguintes grupos experimentais: (1) controle + veículo; (2) controle + guanosina; (3) estresse + veículo; (4) estresse + guanosina. Fluoxetina foi usada como controle positivo no TNF e no teste do campo aberto em um experimento a parte.

1.6. Preparação do tecido

Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram eutanasiados por decapitação e os hipocampus foram removidos e homogeneizados (1:10 p/v) em tampão HEPES (20 mM, pH 7,0). Os homogenatos de tecido foram centrifugados a 16.000 x g a 4 °C por 20 min e os sobrenadantes obtidos foram usados para a determinação das atividades enzimáticas e para a quantificação dos níveis de GSH e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Lowry e colaboradores (1951) usando albumina sérica bovina como padrão.

1.7. Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade da GR foi determinada baseada no protocolo desenvolvido por Carlberg and Mannervik (1985). Resumidamente, a GR reduz a GSSG a GSH às custas de NADPH. Sendo assim, a atividade da GR foi monitorada através do decréscimo na absorbância de NADPH em 340 nm a 37 °C. Os resultados foram baseados no coeficiente da extinção molar de NADPH ($6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A GPx usa GSH para reduzir o terc-butil hidroperóxido, produzindo GSSG o qual, como mencionado acima, é imediatamente reduzido a GSH pela GR usando NADPH como agente redutor. A atividade hipocampal da GPx foi mensurada através de um ensaio de redução de NADPH pelo método desenvolvido por Wendel (1981). O sobrenadante tecidual (em torno de 200 µg de proteína) foi adicionado a uma mistura de reação contendo GSH, GR e NADPH em tampão fosfato (pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de terc-butil hidroperóxido e a diminuição da absorbância foi monitorada em 340 nm a 37 °C. A atividade obtida na ausência das amostras foi subtraída. Os resultados foram baseados em um coeficiente de extinção molar para o NADPH de $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As atividades tanto da GR como da GPx foram expressas em nmol NADPH oxidado/min/mg proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada pelo método de Aebi (1984). A reação teve início com a adição de H_2O_2 a 30 mM e a taxa de sua decomposição pela CAT foi mensurada espectrofotometricamente em 240 nm (a atividade enzimática foi expressa em µmol H_2O_2 consumido/min/mg proteína).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pelo método descrito por Misra e Fridovich (1977). Esse método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação da adrenalina em adrenocromo. A reação colorimétrica foi mensurada em 480 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de auto-oxidação da epinefrina em 50%. A atividade enzimática da SOD foi expressa em U/mg proteína. O espectrofotômetro utilizado para todos os ensaios foi um leitor de placas TECAN (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suíça).

1.8. Conteúdo de glutathiona

O conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) foi mensurado na forma de tióis não-proteicos (NPSH) baseado no protocolo desenvolvido por ELLMAN (1959). Em síntese, os homogenatos foram precipitados em ácido tricloroacético 10%, centrifugados a $5.000 \times g$ a 4 °C por 10 min e os sobrenadantes foram incubados com DTNB (5'5-dithio-bis-2-ácido

nitrobenzóico) em tampão fosfato 1 M, pH 7,0. As absorbâncias foram mensuradas em 412 nm e uma curva padrão da glutationa reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH. Os valores foram expressos em nmol NPSH/mg proteína.

1.9. Formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A formação de TBARS, uma forma de mensuração da peroxidação lipídica, foi determinada nos homogenatos de acordo com o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979) no qual o MDA, um produto final da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico formando um complexo colorimétrico. As amostras foram incubadas a 100 °C por 60 min em meio ácido contendo dodecil sulfato de sódio (0,45%) e ácido tiobarbitúrico (0,67%). Após a centrifugação, o produto da reação foi determinado a 532 nm usando MDA como padrão.

1.10. Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan. Os efeitos principais das variáveis tratamento e estresse foram apresentados apenas quando a interação entre as variáveis não foi significativa. Os dados foram apresentados nas figuras como média + erro padrão da média (EPM). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

2. Resultados

2.1. Guanosina e fluoxetina previnem o aumento no tempo de imobilidade no TNF ocasionado pela exposição ao EC

Devido ao seu alto potencial de mensuração da atividade antidepressiva de fármacos e compostos, o TNF foi utilizado para avaliar o efeito comportamental do EC e do pré-tratamento com guanosina (5 mg/kg, p.o.) nos camundongos. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para a interação EC x guanosina [$F_{(1,29)}=4,33$; $p < 0,01$]. A análise *post-hoc* demonstrou que os animais tratados apenas com guanosina exibiram uma redução significativa no tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 4A). Além disso, os camundongos submetidos ao EC apresentaram um comportamento tipo-depressivo indicado por um aumento no tempo de imobilidade ($p < 0,05$), o qual foi prevenido pela administração de guanosina nos camundongos estressados ($p < 0,01$).

Em outra série de experimentos, um grupo de camundongos foi tratado com o ISRS, fluoxetina (10 mg/kg, p.o.), a fim de avaliar a

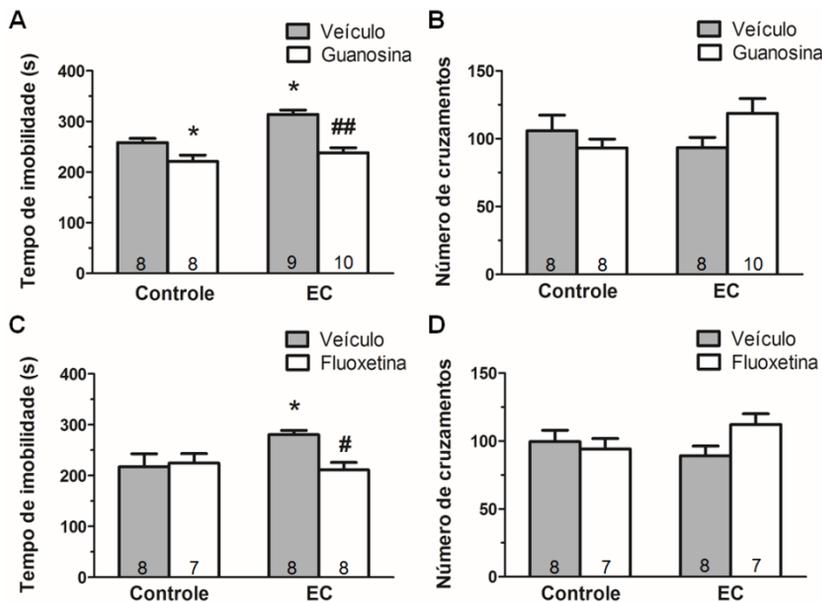
influência de um controle positivo no aumento do tempo de imobilidade desencadeado pelo EC no TNF (Figura 4C). A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para a interação EC x tratamento com fluoxetina [$F_{(1,27)}=4,51$; $p<0,05$]. Como ilustrado na Figura 4C, o EC levou a um aumento significativo no tempo de imobilidade no TNF ($p<0,05$), o qual foi prevenido pelo tratamento com fluoxetina ($p<0,05$). Adicionalmente, o grupo não estressado tratado com fluoxetina não demonstrou alterações no tempo de imobilidade em comparação ao grupo controle.

2.2. Avaliação da atividade locomotora dos animais submetidos ao EC e tratados com guanosina ou fluoxetina no teste do campo aberto

Para descartar a possibilidade da existência de efeito motores não específicos que possam levar a um resultado falso positivo, os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto como ilustra a Figura 4B. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas para o tratamento com guanosina [$F_{(1,30)}=0,38$; $p=0,53$], EC [$F_{(1,30)}=0,60$; $p=0,44$] e interação EC x tratamento [$F_{(1,30)}=1,12$; $p=0,29$], indicando que nenhuma das variáveis afetou a atividade locomotora espontânea dos animais.

Além disso, a Figura 4D demonstra que a fluoxetina também não ocasionou alterações significativas no teste do campo aberto, como evidenciado pelos resultados da ANOVA de duas vias do tratamento [$F_{(1,26)}=0,48$; $p=0,49$], EC [$F_{(1,26)}=0,45$; $p=0,51$] e interação entre EC x tratamento [$F_{(1,26)}=4,01$; $p=0,06$].

Figura 4. Efeito do pré-tratamento com guanosina ou fluoxetina no efeito tipo-depressivo induzido pelo EC no TNF e na atividade locomotora dos animais



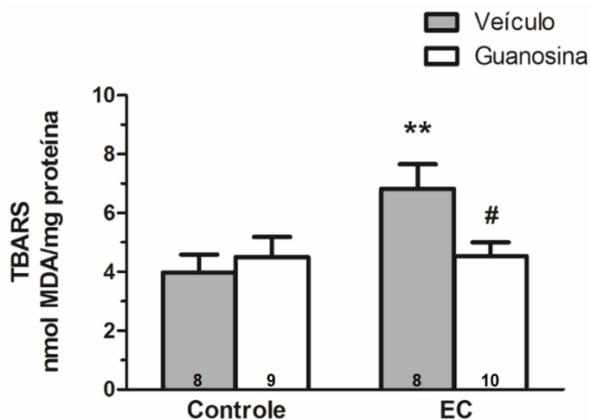
Legenda: Efeito do tratamento com guanosina (5 mg/kg, p.o.) ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no teste do nado forçado (TNF) (A, C) e no teste do campo aberto (B, D) de camundongos submetidos ao protocolo de estresse de contenção (EC). Cada coluna representa a média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

2.3. Efeito do pré-tratamento com guanosina na peroxidação lipídica hipocámpal induzida pelo EC

Devido a baixa meia-vida das EROs, sua mensuração direta é difícil de ser realizada. Sendo assim, os níveis de TBARS foram mensurados, uma vez que o MDA é um produto final da peroxidação lipídica. O aumento na produção de MDA é um indicativo da ocorrência de dano às membranas celulares, levando ao comprometimento funcional e da integridade das células (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Como ilustrado na Figura 5, no presente estudo os camundongos submetidos ao protocolo de EC apresentaram um aumento significativo nos níveis de TBARS hipocampal, o qual foi prevenido pelo tratamento com guanosina [$F_{(1,31)}=4,75$; $p<0,05$]. A análise *post-hoc* indicou que a exposição ao EC aumentou significativamente os níveis de TBARS ($p<0,01$) e que o tratamento com guanosina preveniu essa alteração ($p<0,05$), sugerindo um possível efeito protetor desse nucleosídeo contra a peroxidação lipídica hipocampal. A administração de guanosina no grupo controle não produziu nenhum efeito significativo nos níveis de TBARS hipocampal.

Figura 5. Efeito do tratamento com guanosina na formação de TBARS no hipocampo de animais submetidos ao EC



Legenda: Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no hipocampo de camundongos submetidos ao estresse de contenção (EC) e/ou tratados com guanosina (5 mg/kg, p.o.). Cada coluna representa a média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras. ** $p<0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; # $p<0,01$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

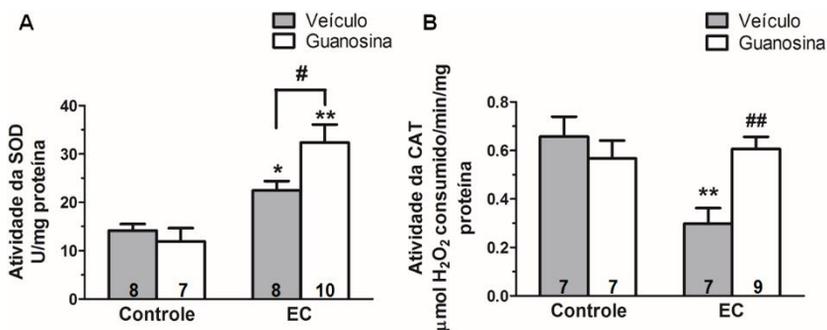
2.4. Perfil antioxidante dos camundongos tratados com guanosina e submetidos ao EC

Os radicais $O_2^{\cdot-}$ são EROs geradas como subproduto da fosforilação oxidativa mitocondrial e síntese de ATP, mas sua geração excessiva está relacionada a ocorrência de dano e morte celular. Nesse

contexto, a SOD é a principal defesa contra os $O_2^{\cdot-}$, catalisando a dismutação destes em H_2O_2 (HUANG; ZOU; CORNIOLA, 2012). No presente estudo, a ANOVA de duas vias referente a atividade da SOD revelou um efeito significativo para a interação EC x guanosina [$F_{(1,29)}=4,52$; $p<0,05$]. O teste *post hoc* indicou que o EC ocasionou um aumento significativo na atividade da SOD em comparação ao grupo controle ($p<0,05$; Figura 6A). O tratamento com guanosina não ocasionou alteração na atividade hipocampal dessa enzima no grupo controle, entretanto, potencializou o efeito estimulatório do EC na atividade dessa enzima ($p<0,01$).

Como mencionado anteriormente, H_2O_2 é o produto da reação catalisada pela SOD, sendo também nocivo aos componentes celulares quando acumulado. Por essa razão, a remoção rápida e eficiente do H_2O_2 é de importância essencial para todas as células que vivem aerobicamente, sendo que a CAT desempenha um papel importante nesse processo (ZAMOCKY et al., 2012). Os resultados ilustrados na Figura 6B demonstram os efeitos do EC e da guanosina na atividade da CAT. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para a interação EC x guanosina [$F_{(1,26)}=8,82$; $p<0,01$]. A análise *post-hoc* demonstrou que os camundongos submetidos ao EC exibiram um decréscimo na atividade hipocampal da CAT em comparação ao grupo controle ($p<0,01$). O tratamento com guanosina preveniu essa redução na atividade da CAT hipocampal ocasionada pela exposição ao EC ($p<0,01$), mas não alterou a atividade dessa enzima nos animais controle.

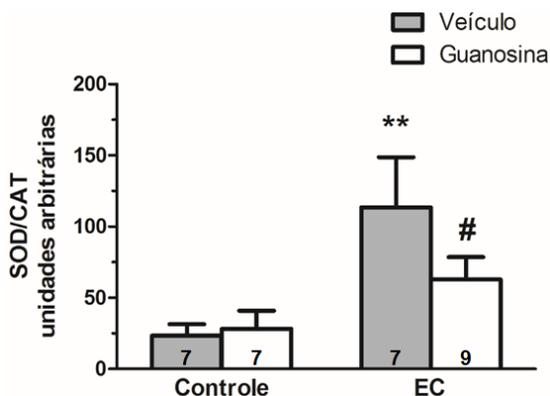
Figura 6. Efeito do tratamento com guanosina nas atividades da SOD e CAT no hipocampo de camundongos submetidos ao EC



Legenda: Efeito do tratamento com guanosina (5 mg/kg, p.o.) na atividade da superóxido dismutase (SOD) (A) e da catalase (CAT) (B) no hipocampo de camundongos submetidos ao estresse de contenção (EC). Cada coluna representa a média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

Além disso, existem evidências de que o aumento na proporção SOD/CAT favorece a ocorrência de altos níveis de H_2O_2 , uma vez que a SOD converte O_2^- a H_2O_2 e a CAT não é capaz de metabolizar todo o H_2O_2 gerado (BEHR et al., 2012; HALLIWELL, 2007). A fim de avaliar um possível desequilíbrio na produção de H_2O_2 , a razão SOD/CAT foi calculada e apresentada na Figura 7. A ANOVA de duas vias revelou uma alteração significativa na proporção SOD/CAT da interação EC x tratamento [$F_{(1,26)}=4,21$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* indicou a ocorrência de um aumento na razão SOD/CAT nos animais submetidos ao EC tratados com veículo ($p < 0,01$), esse desequilíbrio foi reduzido significativamente pelo tratamento com guanosina ($p < 0,05$).

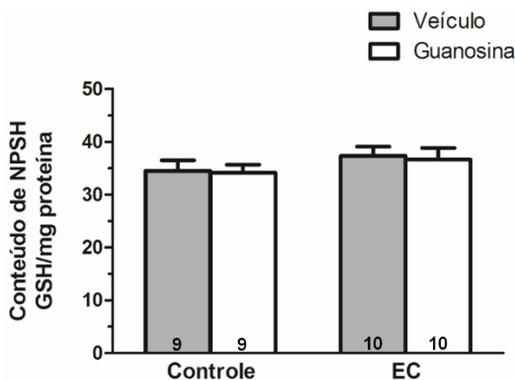
Figura 7. Efeito do tratamento com guanosina na razão SOD/CAT no hipocampo de camundongos submetidos ao EC



Legenda: Cada coluna representa a média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras. ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

A GSH é um importante tiol não-proteico das células de mamíferos e está envolvida na resposta antioxidante através da detoxificação de EROs, mantendo o balanço redox e prevenindo a ocorrência de dano às células (POMPELLA et al., 2003). Como demonstrado na Figura 8, nenhuma alteração foi observada nos níveis de GSH tanto nos animais controle submetidos ao EC [$F_{(1,34)}=1,86$; $p=0,18$] quanto nos tratados com guanosina estressados [$F_{(1,34)}=0,10$; $p=0,92$] ou controle [$F_{(1,34)}=0,07$; $p=0,78$].

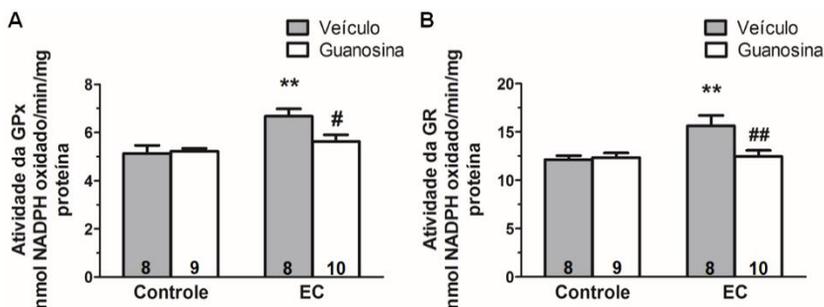
Figura 8. Efeito do tratamento com guanosina nos níveis de GSH hipocampal em animais submetidos ao EC



Legenda: Níveis de glutathiona (GSH) no hipocampo de animais submetidos ao estresse de contenção (EC) e/ou tratamento com guanosina (5 mg/kg, p.o.). Cada coluna representa a média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras.

O mecanismo de detoxificação dependente de GSH envolve também a enzima GPx, reduzindo peróxidos aos seus álcoois correspondentes e água. Essa reação produz GSSG, a qual pode ser convertida de volta a GSH na reação catalisada pela GR (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003). Em relação a atividade dessas enzimas, a ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo da interação EC x guanosina tanto para a atividade da GPx [$F_{(1,31)}=4,42$; $p<0,05$] quanto para a GR [$F_{(1,31)}=5,90$; $p<0,05$]. A análise *post-hoc* indicou que a exposição ao EC resultou em um aumento nas atividades da GPx ($p<0,05$; Figura 9A) e da GR ($p<0,05$; Figura 9B) hipocampais, os quais foram prevenidos pelo tratamento com guanosina ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente).

Figura 9. Efeito do EC e/ou tratamento com guanosina nas atividades da GPx e da GR no hipocampo



Legenda: Atividade da glutaciona peroxidase (GPx) (A) e da glutaciona redutase (GR) (B) no hipocampo de animais submetidos ao estresse de contenção (EC) e/ou tratados com guanosina (5 mg/kg, p.o.). Cada coluna representa a média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras. ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

3. Discussão

O presente estudo avaliou, pela primeira vez, a capacidade da guanosina em prevenir alterações bioquímicas e comportamentais induzidas pela exposição a um modelo de estresse. O EC tem sido proposto como um modelo que desencadeia alterações neuroquímicas no cérebro de camundongos, as quais podem ser nocivas para o funcionamento do SNC. Entre essas alterações, são reportados um aumento na liberação de glutamato (SATO; SHIMEKI, 2010) e um desequilíbrio nos parâmetros oxidativos/antioxidantes (FREITAS et al., 2014; KUMAR; GARG; PRAKASH, 2010) em roedores. O aumento na produção de EROs e/ou ineficiência nos sistemas de defesa antioxidante consequentes a exposição dos animais ao EC levam a ocorrência de estresse oxidativo, um fenômeno implicado na fisiopatologia de diversas doenças psiquiátricas, incluindo a depressão (BILICI et al., 2001; VALKO et al., 2007).

O TNF mensura o tempo de imobilidade dos animais expostos a uma situação inescapável sendo que, um aumento nesse parâmetro é considerado como um comportamento passivo, associado a redução na busca por formas ativas de lidar com estímulos estressantes nos animais (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004; MORETTI et al., 2013). No presente

trabalho, a exposição ao EC ocasionou um aumento no tempo de imobilidade dos camundongos no TNF quando comparados ao grupo controle. Curiosamente, o tratamento com uma dose oral de guanosina (5 mg/kg) resultou em um efeito tipo-antidepressivo em camundongos controle, o qual não foi observado em camundongos administrados com fluoxetina (10 mg/kg). Essa ausência de efeito observada nos camundongos administrados com fluoxetina pode ser devido ao fato de que esse antidepressivo foi administrado em dose única 8 h e 40 min antes do TNF. Sendo assim, o período de tempo entre a administração e o teste não foi capaz de causar uma redução no tempo de imobilidade dos animais provavelmente devido ao efeito anti-imobilidade da fluoxetina estar relacionado a alterações monoaminérgicas que ocorrem agudamente após sua administração. Além disso, o fato de que apenas a guanosina produziu um efeito tipo-antidepressivo no grupo controle reforça a ideia de que moduladores do sistema glutamatérgico apresentam propriedades antidepressivas que diferem dos agentes monoaminérgicos (ZARATE et al., 2010). Contudo, a fluoxetina foi capaz de prevenir o aumento no tempo de imobilidade provocado pelo EC, um resultado similar a estudos prévios que demonstram a capacidade desse agente farmacológico de prevenir o comportamento tipo-depressivo de camundongos expostos a um estressor (CAPRA et al., 2010; MORETTI et al., 2013). Cabe ressaltar ainda que, o fato de nenhum dos grupos apresentar diferenças significativas no teste do campo aberto descarta a possibilidade de interferências do EC ou dos tratamentos na atividade locomotora dos animais.

A análise da peroxidação lipídica confirmou a ocorrência de dano oxidativo, uma vez que um aumento nos níveis de MDA foi encontrado no hipocampo de camundongos submetidos ao EC. Essa alteração que segue a submissão dos camundongos a esse procedimento corrobora achados de estudos prévios, reforçando a ideia de que esse modelo animal é capaz de gerar uma resposta oxidativa (AHMAD et al., 2012; FONTELLA et al., 2005; FREITAS et al., 2014). Além disso, a administração oral de guanosina antes do EC preveniu o aumento na peroxidação lipídica hipocampal observada no ensaio de TBARS, sugerindo a ocorrência de um efeito neuroprotetor em camundongos tratados com esse nucleosídeo. Levando em conta que alterações oxidativas têm sido cada vez mais reconhecidas como um fator crítico na fisiopatologia da depressão induzida pelo estresse (MAES et al., 2011), a capacidade da guanosina em prevenir alterações comportamentais relacionadas ao estresse no TNF é possivelmente relacionada ao seu efeito protetor contra o dano oxidativo hipocampal. É digno de nota que essa associação entre a depressão maior e a peroxidação lipídica é também observada em estudos clínicos (MAES

et al., 2011; TSUBOI et al., 2006), assim como a redução nos níveis de MDA quando os pacientes são tratados com antidepressivos (GALECKI et al., 2009; MICHALAKEAS et al., 2011).

Um dos principais fatores implicados no dano oxidativo induzido pelo estresse é a produção excessiva de radicais O_2^- , os quais podem levar à atrofia neuronal no encéfalo (SEO et al., 2012). Uma possibilidade para explicar as alterações na atividade da SOD observadas no presente estudo é a de que o aumento nos níveis dos radicais O_2^- ocasionado pelo EC esteja levando a ativação de mecanismos de resposta ao estresse. De fato, EROs são capazes de estimular o Nrf2, um regulador primário da transcrição de uma grande quantidade de antioxidantes endógenos, incluindo a SOD e HO-1 (DERAMAUDT; DILL; BONAY, 2013). Além disso, embora o grupo controle tratado com guanosina não tenha apresentado uma alteração na atividade da SOD, esse nucleosídeo ocasionou um efeito aditivo na atividade dessa enzima quando associado ao EC. Esses achados sugerem que a atividade antioxidante endógena desencadeada pela guanosina pode ser dependente da presença de um estressor. Cabe ressaltar ainda que evidências experimentais demonstram que a guanosina exerce efeitos neuroprotetores e neuritogênicos mediados pela HO-1 (BAU et al., 2005; DAL-CIM et al., 2012), uma enzima cujo aumento na expressão está associado com a elevação dos níveis da SOD em diversos tecidos (FAN et al., 2012; KHALAJ et al., 2013; TURKSEVEN et al., 2005). Sendo assim, existe a possibilidade de que parte dos efeitos da guanosina observados no presente trabalho estejam relacionados com a estimulação da sinalização via Nrf2. Entretanto, futuros estudos são necessários para confirmar essa hipótese em modelos de estresse.

O aumento na atividade da SOD em camundongos estressados pode gerar quantidades significativas de H_2O_2 , os quais por sua vez, podem estimular enzimas que convertem este peróxido em água e oxigênio molecular. De fato, essa pode ser uma possível explicação para o aumento na atividade da GPx encontrado nos camundongos estressados tratados com veículo, embora os dados também demonstrem que o EC levou a uma redução na atividade da CAT neste grupo. Entretanto, esses resultados estão de acordo com outros estudos que encontraram uma redução na atividade da CAT hipocampal após exposição ao EC (FREITAS et al., 2014; KHALAJ et al., 2013; KUMAR; GARG; PRAKASH, 2010). O H_2O_2 pode ser metabolizado em $OH\cdot$ sendo que, a geração excessiva desses radicais provavelmente está envolvida na iniciação da peroxidação lipídica observada no presente estudo, uma vez que um aumento na atividade da SOD foi encontrado em associação com um declínio na atividade da CAT nos animais estressados. Além disso, a análise da proporção SOD/CAT não

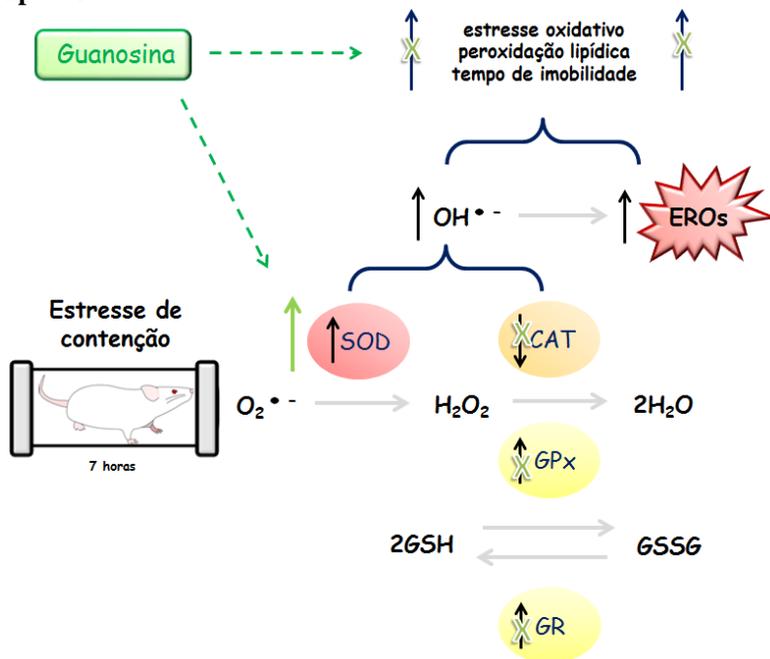
demonstrou um desequilíbrio significativo nos camundongos expostos ao EC tratados com guanosina. Esse achado pode ser devido ao fato que, embora esse nucleosídeo tenha desencadeado uma resposta que leva a um aumento na atividade da SOD em camundongos expostos ao EC, a geração excessiva de H_2O_2 induzida por essa resposta pode ter sido, pelo menos parcialmente, neutralizada pelo restabelecimento da atividade da CAT induzido pela guanosina. Entretanto, outros mecanismos ainda não investigados podem ter desempenhado um papel relevante na neutralização do estresse oxidativo observada no presente trabalho como a capacidade que esse nucleosídeo tem de estimular a captação de glutamato em situações de insulto (DAL-CIM et al., 2013; FRIZZO et al., 2002) ou de induzir a HO-1 (BAU et al., 2005; DAL-CIM et al., 2012), uma enzima capaz de prevenir a formação de $OH\cdot$ a partir do H_2O_2 (BILBAN et al., 2008; GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). Sendo assim, futuros estudos devem esclarecer a participação da prevenção de eventos excitotóxicos, assim como da atividade da HO-1 no restabelecimento do equilíbrio oxidante/antioxidante induzido pela guanosina em modelos de estresse.

Diversos estudos têm reportado que compostos antioxidantes apresentam propriedades antidepressivas (ABOUL-FOTOUH, 2013; LOBATO et al., 2010; SRINIVASAN et al., 2012), incluindo a GSH (ROSA; DAFRE; RODRIGUES, 2013). Entretanto, embora uma alteração nos níveis de GSH tenha sido observada em pacientes depressivos (KODYDKOVÁ et al., 2009; RYBKA et al., 2013), no presente estudo nenhum dos grupos apresentou uma alteração significativa nos níveis hipocámpais desse antioxidante endógeno. Cabe ressaltar que essas alterações nos níveis de GSH em pacientes depressivos foram avaliadas principalmente no soro e, embora exista um estudo *post-mortem* indicando um decréscimo no córtex pré-frontal (GAWRYLUK et al., 2011), ainda não está claro se os níveis hipocámpais desse antioxidante estão alterados em pacientes. Além disso, assim como no presente trabalho, outros estudos também observaram que a exposição ao EC causa um desequilíbrio em diversos parâmetros oxidativos/antioxidantes sem causar alterações nos níveis de GSH (BUDNI et al., 2013; MÉNDEZ-CUESTA et al., 2011; MORETTI et al., 2013), um fenômeno possivelmente relacionado com a capacidade da célula de restaurar os níveis desse peptídeo após insultos pró-oxidativos. O sistema antioxidante relacionado a GSH foi também investigado através da mensuração da atividade das enzimas GPx e GR. A respeito desses parâmetros, um aumento nas atividades da GPx e da GR foi encontrado no hipocampo dos camundongos submetidos ao EC, uma resposta provavelmente relacionada ao aumento na geração de EROs que

sucedo o estressor. Sendo assim, a capacidade da guanosina de prevenir essa alteração observada no presente estudo provavelmente está relacionada com a atenuação do dano oxidativo ocasionada por esse nucleosídeo.

Apesar do fato de a depressão maior ser uma das doenças psiquiátricas mais comuns e estar associada com altas taxas de incapacitação, as alternativas terapêuticas existentes até o momento apresentam uma grande variedade de efeitos colaterais e um efeito tardio que pode levar semanas para ocorrer (COVINGTON; VIALOU; NESTLER, 2010; ZARATE JR. et al., 2006). Nesse contexto, tem sido demonstrado que compostos com atividade antioxidante, assim como moduladores do sistema glutamatérgico, são alvos promissores para a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento desse transtorno (NICIU et al., 2013b; SCAPAGNINI et al., 2012). O fato de que a excitotoxicidade e o estresse oxidativo agem em sinergismo na geração de dano neuronal (TROTTI; DANBOLT; VOLTERRA, 1998), somado a observação de que a guanosina é um composto de baixa toxicidade (SCHMIDT et al., 2010a), tornam esse nucleosídeo um importante alvo a ser investigado como futuro agente terapêutico no tratamento da depressão.

Figura 10. Diagrama esquemático com os resultados referentes ao Capítulo 1



Legenda: O pré-tratamento com guanosina 1 h antes da exposição dos animais ao estresse de contenção por 7 h preveniu a ocorrência de estresse oxidativo e o comportamento tipo-depressivo induzidos por esse modelo. Esse composto também preveniu o aumento na atividade das enzimas GPx e GR e a redução na atividade da CAT, induzidos pelo estressor. Além disso, a guanosina apresentou um efeito aditivo com a estimulação da atividade da SOD desencadeada pelo estresse de contenção. *Abreviaturas: CAT, catalase; EROs, espécies reativas de oxigênio; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione reduzida; GSSG, glutathione oxidada; SOD, superóxido dismutase. Fonte: Autor.*

Este capítulo originou o seguinte artigo:

BETTIO, L. E.; FREITAS, A. E.; NEIS, V. B.; SANTOS, D.B.; RIBEIRO, C. M.; ROSA, P. B.; FARINA, M.; RODRIGUES, A.L.S. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 127, p. 7-14, 2014.

CAPÍTULO 2 – O EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM GUANOSINA ESTÁ ASSOCIADO A UM AUMENTO NA DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

Um dos mecanismos envolvidos nos efeitos protetores da guanosina é sua capacidade de estimular a síntese de fatores neurotróficos (RATHBONE et al., 2008; SU et al., 2009, 2013). Nesse contexto, o tratamento crônico com esse nucleosídeo tem se mostrado capaz de estimular a proliferação celular e a diferenciação neuronal em associação com uma melhora funcional em modelos animais de patologias ou insulto no SNC (JIANG et al., 2007, 2008a; SU et al., 2009). Além disso, sabe-se que a guanosina estimula a diferenciação e neuritogênese em diversos tipos celulares, incluindo neurônios hipocâmpais (BAU et al., 2005; GUARNIERI et al., 2009; NALIWAIKO et al., 2008).

O hipocampo é uma estrutura límbica que continua a produzir novos neurônios durante a vida adulta, um processo que é regulado e influenciado por múltiplas atividades fisiológicas e patológicas (CHRISTIE; CAMERON, 2006; SPALDING et al., 2013). A neurogênese hipocâmpal ocorre na ZSG do GD, onde células recém-nascidas no cérebro adulto podem adquirir um fenótipo neuronal e estabelecer conectividade sináptica com outros neurônios hipocâmpais (OVERSTREET-WADICHE; WESTBROOK, 2006; ZHAO; DENG; GAGE, 2008). A incorporação dos neurônios recém-nascidos em circuitarias neurais existentes contribui para o funcionamento hipocâmpal, a qual acredita-se desempenhar um papel em certos aspectos da cognição como o aprendizado e memória, assim como em processos afetivos como a modulação do humor (DENG; AIMONE; GAGE, 2010; EISCH; PETRIK, 2012)

Como analisado no capítulo anterior, o tratamento agudo com guanosina apresenta atividade tipo-antidepressiva associada a um efeito neuroprotetor contra o dano hipocâmpal induzido pelo estresse agudo. Entretanto, ainda não está claro se essa atividade tipo-antidepressiva persiste após administração crônica e se esse nucleosídeo pode desencadear alterações na proliferação celular e/ou diferenciação neuronal no hipocampo. Sendo assim, o presente capítulo buscou avaliar os efeitos do tratamento crônico com guanosina no teste de suspensão pela cauda (TSC) e sua influência sobre a proliferação celular e diferenciação neuronal no hipocampo.

1. Materiais e métodos

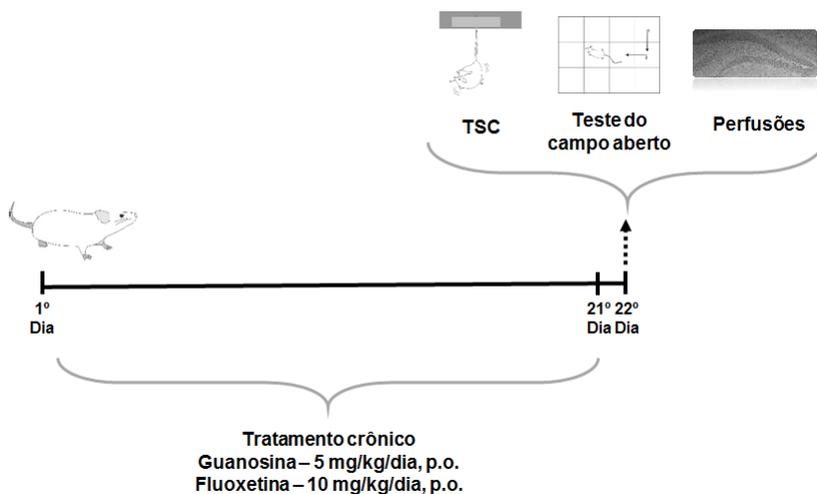
1.1. Animais

Camundongos Swiss fêmeas (35-45 g), mantidos a 20-22 °C com acesso livre à água e comida submetidos a um ciclo claro/escuro de 12:12 h (luzes acesas às 7:00) foram utilizados em todos os experimentos (6-8 animais por grupo). Todos os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 h e todos os esforços feitos para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados nos experimentos. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° 00795).

1.2. Agentes farmacológicos e tratamento

Guanosina e fluoxetina (controle positivo) (ambos Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) foram dissolvidas em água destilada e administradas por via oral (p.o.) nas doses de 5 e 10 mg/kg, respectivamente, uma vez ao dia por um período de 21 dias (sempre entre 9:00 e 10:00 h). As doses utilizadas foram escolhidas baseadas em estudos prévios (BETTIO et al., 2014; MORETTI et al., 2013), sendo os efeitos da guanosina e fluoxetina avaliados em protocolos experimentais conduzidos separadamente. As soluções foram preparadas diariamente antes do tratamento e administradas em um volume de 10 ml/kg, sendo que o grupo veículo (controle) recebeu água destilada por via oral (10 ml/kg). No 22° dia, 24 h após o último tratamento, os animais foram submetidos ao TSC e ao teste do campo aberto e, subsequentemente eutanasiados para a realização de perfusões transcardíacas (Figura 1). Os encéfalos foram então removidos e processados para análises imunohistoquímicas de proliferação celular e diferenciação neuronal no hipocampo.

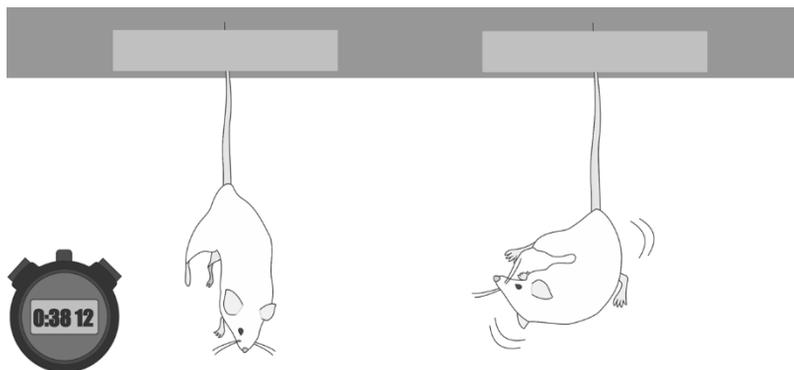
Figura 1. Diagrama dos procedimentos experimentais



Legenda: Os animais receberam uma administração diária de guanosina (5 mg/kg, p.o.) ou fluoxetina (5 mg/kg, p.o.) por 21 dias e, no 22º dia foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC) e teste do campo aberto. Após os testes comportamentais, os camundongos foram perfundidos e os encéfalos processados para análise imunohistoquímica de proliferação celular e diferenciação neuronal no hipocampo.

1.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

O TSC é baseado na premissa de que animais submetidos ao estresse inescapável de serem suspensos pela cauda desenvolvem uma postura de imobilidade, a qual é reduzida por intervenções com potencial antidepressivo. A duração total da imobilidade foi mensurada de acordo com o método descrito por Steru et al. (1985). Os camundongos foram isolados e suspensos por uma fita adesiva (50 cm de altura) localizada aproximadamente 1 cm a partir do ponta da cauda. O tempo de imobilidade foi registrado durante um período de 6 minutos (Figura 2).

Figura 2. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

Legenda: O TSC é um modelo preditivo para atividade antidepressiva no qual camundongos suspensos pela cauda adotam uma postura de imobilidade frente a essa situação inescapável. O tempo de imobilidade durante um período de 6 minutos é mensurado, sendo que uma redução no mesmo é considerada como um efeito tipo-antidepressivo.

1.4. Teste do campo aberto

Os camundongos foram avaliados no teste do campo aberto a fim de descartar alterações na atividade locomotora como uma possível interferência na interpretação dos resultados obtidos no TSC (BETTIO et al., 2014; NEIS et al., 2015). O teste foi realizado conforme descrito no Capítulo 1 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.5. Processamento dos tecidos

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de hidrato de cloral 40% e perfundidos transcardiacamente com 0,9% cloreto de sódio (NaCl) seguido de paraformaldeído (PFA) 4%. Os cérebros foram removidos e colocados em PFA 4% *overnight* a 4 °C, sendo em seguida transferidos para sacarose 30%. Após a saturação em sacarose, secções coronais de 30 µm de espessura foram obtidas utilizando um vibrátomo (Leica VT1000S, Nussloch, Alemanha). As secções foram coletadas, separadas em amostras fracionadas (1/6 das secções) e estocadas em solução crioprotetora [0,04 M solução salina tamponada com Tris (TBS), 30% etileno glicol, 30% glicerol] a 4 °C.

1.6. Imunohistoquímicas

Duas séries adjacentes de secções cerebrais foram processadas para detecção dos marcadores endógenos de proliferação Ki-67, uma proteína nuclear que é expressa durante todas as fases ativas do ciclo celular, mas ausente em células em repouso (KEE et al., 2002; VON BOHLEN UND HALBACH, 2011), e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), a qual é expressa durante todas as fases ativas do ciclo celular e por um curto período de tempo após as células se tornarem pós-mitóticas (CHRISTIE; CAMERON, 2006; VON BOHLEN UND HALBACH, 2011). Uma série posterior de secções cerebrais foi utilizada para realizar imunohistoquímica para a proteína fator de diferenciação (NeuroD), um fator de transcrição hélice-volta-hélice que é expresso durante os estágios iniciais da diferenciação neuronal (BROWN et al., 2003; BRUNET; GHYSEN, 1999; MIYATA; MAEDA; LEE, 1999).

1.6.1. Ki-67

As secções cerebrais foram incubadas em ácido cítrico (dissolvido em 0,1 M TBS) por 5 min a 95°C. Esse processo foi repetido duas vezes para garantir a exposição do antígeno. Após lavadas três vezes com 0,1 M TBS, as secções foram mantidas em peróxido de hidrogênio 3% (em 0,1 M TBS e 10% metanol) por 10 min a temperatura ambiente. Os tecidos foram então colocados em solução bloqueadora 5% (0,1 M TBS com 5% soro normal de cabra e 0,25% Triton X-100) e incubados com anticorpo primário policlonal de coelho contra Ki-67 (1:500; VP-K451, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 48 h a 4°C. As soluções foram lavadas com 0,1 M TBS e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado com biotina contra IgG de coelho (1:200; BA-1000, Vector Laboratories) em 5% solução bloqueadora por 2 h à temperatura ambiente. Após lavar (3 vezes em 0,1 M TBS), as secções foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit PK4000, Vector Laboratories) por 1 h e os anticorpos ligados foram visualizados com o cromogênio 2,2-diaminobenzedina (DAB; DAB kit SK 4100, Vector Laboratories). As secções foram montadas em lâminas para microscópio revestidas com gelatina 2% e desidratadas através da exposição a soluções de etanol em concentrações crescentes (50%, 70%, 95%) seguido pela incubação por 5 min em Citrisolv (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, EUA). As lâminas foram então cobertas com Permount e lamínulas (Fisher Scientific).

1.6.2. PCNA

As secções cerebrais passaram por duas incubações em ácido cítrico (dissolvido em 0,1 M TBS) a 95°C com duração de 5 min cada. Posteriormente, as secções foram lavadas três vezes em tampão fosfatossalina (PBS) 0,1 M e em seguida mantidas em peróxido de hidrogênio 3% (0,1 M PBS e 10% methanol) por 10 min a temperatura ambiente. Os tecidos foram então colocados em solução bloqueadora (0,1 M PBS com soro normal de cabra 5% e 0,25% Triton X-100) e incubados com anticorpo primário policlonal de coelho contra PCNA (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) por 48 h a 4°C. As secções foram enxaguadas em 0,1 M PBS e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado com biotina contra IgG de coelho (1:200; BA-1000, Vector Laboratories) em solução bloqueadora 5% por 2 h a temperatura ambiente. Os anticorpos ligados foram visualizados através dos métodos descritos acima (Seção 1.6.1).

1.6.3. NeuroD

As secções cerebrais foram mantidas em peróxido de hidrogênio 3% por 15 min a temperatura ambiente e subsequentemente lavadas três vezes em TBS 0,1 M. Em seguida, foram colocadas em solução bloqueadora 5% (TBS 0,1 M, soro normal de cavalo 5%, 0,25% Triton X-100) e incubados com um anticorpo primário policlonal de cabra contra NeuroD (1:200; SC-1084, Santa Cruz Biotechnology) por 48 h a 4°C. As secções foram enxaguadas em 0,1 M TBS e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado com biotina contra IgG de cabra (1:200; BA-9500, Vector Laboratories) em solução bloqueadora 5% a temperatura ambiente por 2 h. Os anticorpos ligados foram visualizados através dos métodos descritos acima (Seção 1.6.1).

1.7. *Quantificação morfológica por microscopia convencional*

Todas as análises morfológicas foram conduzidas em lâminas codificadas (sem que o experimentador tivesse conhecimento da identidade das amostras), usando um microscópio Olympus BX51 equipado com objetivas de 10 ×, 40 ×, e 100 × (Olympus, Center Valley, PA, EUA). Para a captura de imagem foram usados os programas Image Pro-Plus (versão 6.0 para Windows™, Media Cybernetic Inc., Silver Spring, MD, EUA) e uma câmara Cool Snap HQ (Photometrics, Tucson, AZ, EUA). O número total de células Ki-67-, PCNA- e NeuroD-imunopositivas presentes na ZSG do GD inteiro (Bregma -1.34 a -3.16; aproximadamente 10 secções coronais por cérebro), GD dorsal (Bregma -1.34 a -2.18; aproximadamente 5 secções coronais por cérebro), e GD ventral (Bregma -2.30 a -3.16;

aproximadamente 5 secções coronais por cérebro) (PAXINOS; FRANKLIN, 2001) foram quantificados através de contagem manual das células DAB-positivas presentes dentro de um diâmetro de 2-3 células da ZSG. Os resultados foram expressos como número total de células marcadas na sub-região do GD do hipocampo através da multiplicação da média do número de células marcadas no GD das secções mensuradas pelo número total de secções de 30 μm de espessura contidos no GD inteiro (60 fatias), GD dorsal (30 fatias), ou GD ventral (30 fatias). As imagens foram processadas com o Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, Mountain View, CA, EUA). Apenas ajustes de contraste e cor foram realizados.

1.8. Análise estatística

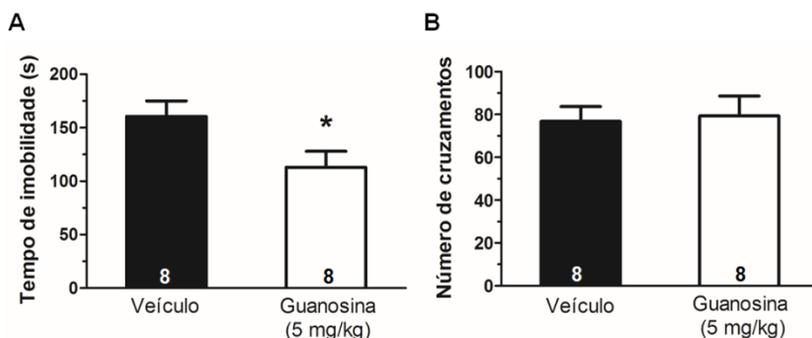
As análises estatísticas foram conduzidas no programa Statistica 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Os dados foram apresentados nas figuras como média + EPM. As diferenças entre os valores das médias dos grupos experimentais foram comparadas usando teste *t* de Student não pareado. A relação entre o tempo de imobilidade e as células imunopositivas no GD foram avaliadas através do coeficiente de correlação de Pearson. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

2. Resultados

2.1. Efeitos do tratamento crônico com guanosina ou fluoxetina no TSC e no teste do campo aberto

O TSC é um teste preditivo para atividade antidepressiva no qual o desenvolvimento de uma postura de imobilidade é considerado uma ruptura com a forma ativa na qual os camundongos lidam com estímulos estressantes (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). No presente estudo, camundongos tratados com guanosina (5 mg/kg, p.o.) por um período de 21 dias apresentaram uma redução no tempo de imobilidade no TSC ($p < 0,05$; Figura 3A), um indicativo da atividade tipo-antidepressiva induzida pelo tratamento crônico com esse composto. Além disso, esse efeito não foi acompanhado por alterações na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto ($p = 0,83$; Figura 3B), descartando a possibilidade de uma interferência psicoestimulante.

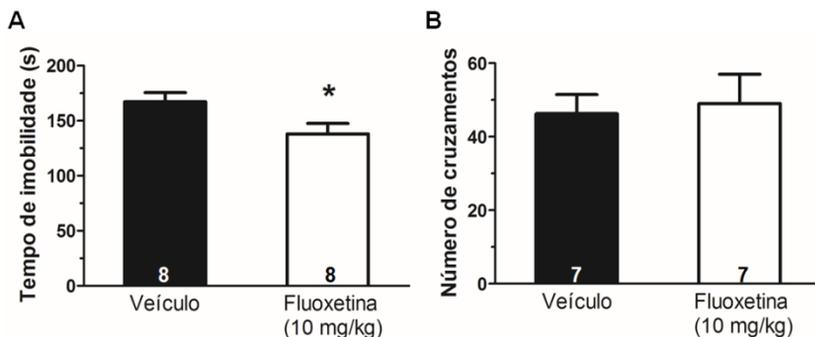
Figura 3. Efeito do tratamento crônico com guanosina no TSC e no teste do campo aberto



Legenda: Efeito do tratamento crônico com guanosina (5 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC) (A) e na atividade locomotora no teste do campo aberto (B). Os valores estão representados como média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo (controle) (teste *t* de Student).

A fim de comparar os efeitos da guanosina com os de um antidepressivo convencional, um grupo adicional de camundongos foi tratado com fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) por 21 dias (controle positivo). De forma similar ao tratamento com guanosina, a administração crônica de fluoxetina ocasionou uma redução no tempo de imobilidade no TSC ($p < 0,05$; Figura 4A) sem alterar a atividade locomotora ($p = 0,78$; Fig. 4B).

Figura 4. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina no TSC e no teste do campo aberto

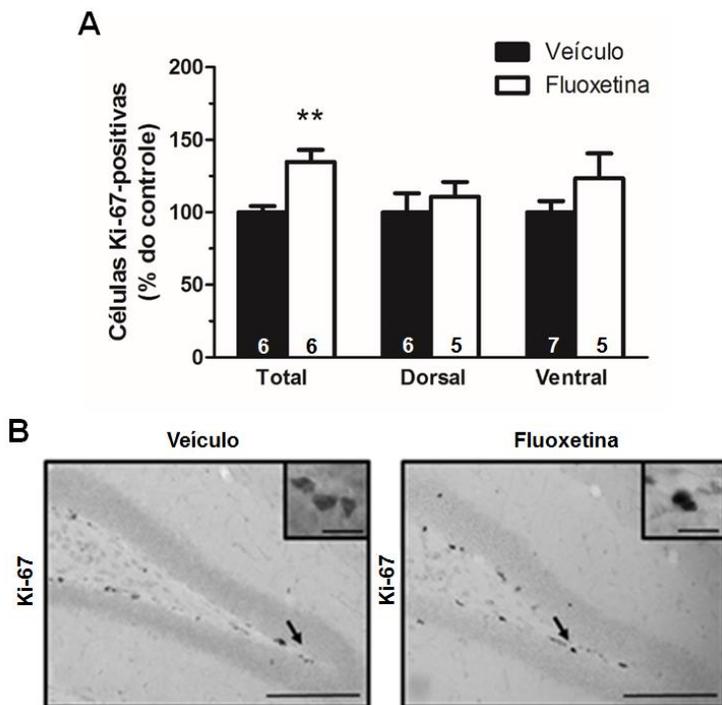


Legenda: Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC) (A) e na atividade locomotora no teste do campo aberto (B). Os valores estão representados como média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo (controle) (teste t de Student).

2.2. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou guanósina na proliferação celular hipocampal

Os efeitos do antidepressivo convencional fluoxetina e da guanósina na proliferação celular hipocampal foram avaliados por imunohistoquímica para a proteína endógena envolvida no ciclo celular Ki-67 (VON BOHLEN UND HALBACH, 2011). O tratamento crônico com fluoxetina (10 mg/kg, p.o., 21 dias) resultou em um aumento no número total de células Ki-67-positivas presentes na ZSG ($p < 0,05$). Entretanto, quando a proliferação celular nas porções dorsal e ventral dessa estrutura foram avaliadas separadamente, nenhuma diferença significativa foi encontrada no número de células Ki-67-positivas tanto no aspecto dorsal ($p = 0,55$) quanto no aspecto ventral ($p = 0,20$) dessas sub-regiões do GD (Figura 5).

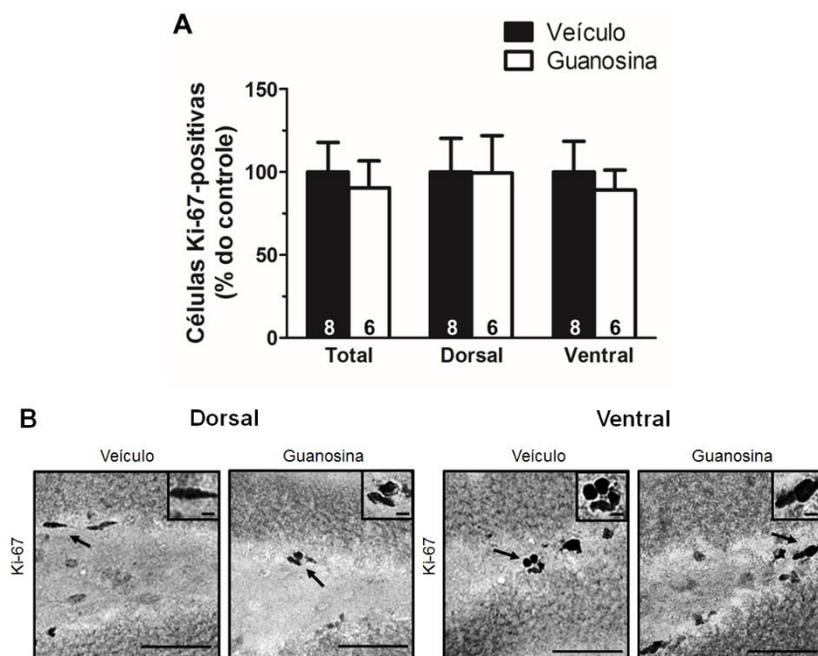
Figura 5. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina na proliferação celular avaliada por imunohistoquímica para Ki-67



Legenda: Um aumento significativo no número de células proliferativas Ki-67-positivas foi encontrado no giro dentado (GD) hipocampal inteiro dos camundongos tratados com fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) em comparação com o grupo controle. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa nos aspectos dorsal e ventral dessa estrutura quando analisados isoladamente. Os valores estão representados como média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras (A). Fotomicrografias representativas dos efeitos do tratamento crônico com veículo ou guanosina na expressão do marcador endógeno de proliferação celular Ki-67 (indicado pelas setas) magnificadas em 10 x (barra de escala = 100 μ m) e 40 x (barra de escala = 10 μ m) no GD do hipocampo ventral (B). ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo tratado com veículo (controle) (teste *t* de Student).

Em contraste, a administração crônica de guanosina (5 mg/kg, p.o., 21 dias) não apresentou um efeito significativo no número de células Ki-67-positivas presentes na ZSG tanto do hipocampo inteiro ($p=0,71$), quanto de seus aspectos dorsal ($p=0,98$), ou ventral ($p=0,66$) (Figura 6), indicando que o tratamento com guanosina não ocasionou um impacto significativo na proliferação celular hipocampal.

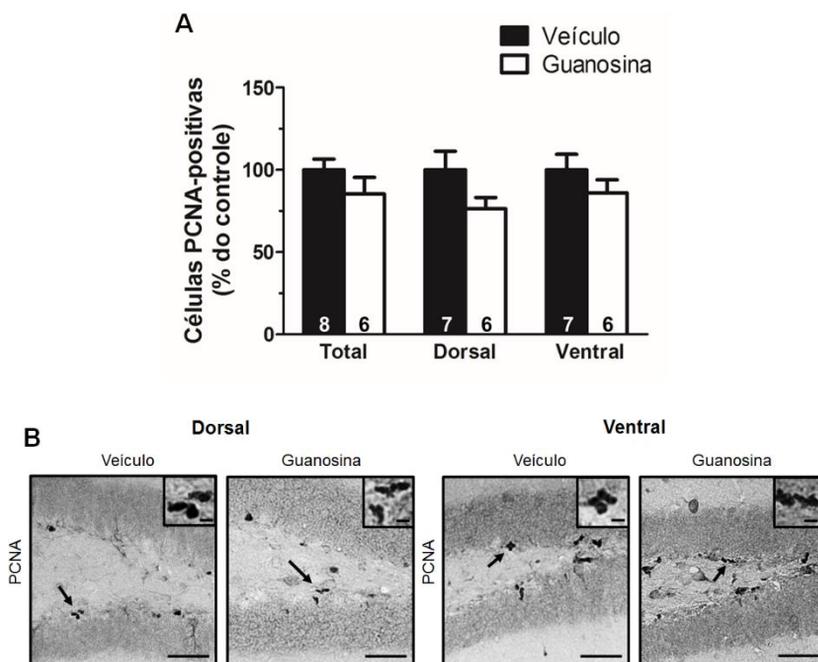
Figura 6. Efeito do tratamento crônico com guanosina na proliferação celular avaliada por imunohistoquímica para Ki-67



Legenda: Nenhuma diferença significativa no número de células proliferativas Ki-67-positivas foi observada entre os camundongos tratados com veículo ou guanosina (5 mg/kg, p.o.), tanto no giro dentado (GD) inteiro, quanto em seus aspectos dorsal e ventral. Os valores estão representados como média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras (A). Fotomicrografias representativas dos efeitos do tratamento crônico com veículo ou guanosina na expressão do marcador endógeno de proliferação celular Ki-67 (indicado pelas setas) magnificadas em 20 x (barra de escala = 50 μ m) e 40 x (barra de escala = 10 μ m) nos GDs dorsal e ventral (B).

A fim de confirmar os resultados obtidos com Ki-67, foi realizada imunohistoquímica para PCNA, um marcador adicional de proliferação celular avaliado (Figura 7) (CHRISTIE; CAMERON, 2006; VON BOHLEN UND HALBACH, 2011). Novamente, a análise estatística não revelou diferença significativa entre os grupos tratados com veículo e guanosina no que se refere a proliferação celular como demonstra a análise do número de células PCNA-positivas presentes no GD hipocampal inteiro ($p=0,23$), assim como em seus aspectos dorsal ($p=0,12$) ou ventral ($p=0,29$).

Figura 7. Efeito do tratamento crônico com guanósina na proliferação celular avaliada por imunohistoquímica para PCNA



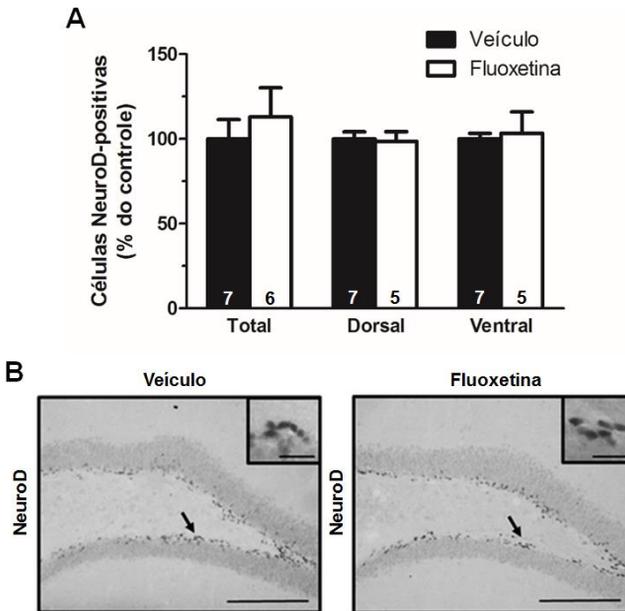
Legenda: Nenhuma diferença significativa no número de células proliferativas PCNA-positivas foi observada entre os camundongos tratados com veículo ou guanósina (5 mg/kg, p.o.), tanto no giro denteado (GD) inteiro, quanto em seus aspectos dorsal ou ventral. Os valores estão representados como média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras (A). Fotomicrografias representativas dos efeitos do tratamento crônico com veículo ou guanósina na expressão do marcador endógeno de proliferação celular PCNA (indicado pelas setas) magnificadas em 20 x (barra de escala = 50 μ m) e 40 x (barra de escala = 10 μ m) nos GDs dorsal e ventral (B).

2.3. Efeito do tratamento crônico com guanósina na diferenciação neuronal hipocampal

A fim de avaliar os efeitos do tratamento com fluoxetina ou guanósina na diferenciação neuronal hipocampal, foram conduzidas imunohistoquímicas para NeuroD (Figura 8), um fator de transcrição

hélice-volta-hélice conhecido por ser suficiente para promover a diferenciação neuronal de progenitores neurais no hipocampo adulto (HSIEH et al., 2004). Camundongos submetidos ao tratamento crônico com fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) não apresentaram uma alteração significativa no número de células NeuroD-positivas presentes na ZSG total ($p=0,53$) ou nas porções dorsal ($p=0,83$) e ventral ($p=0,78$) dessa estrutura.

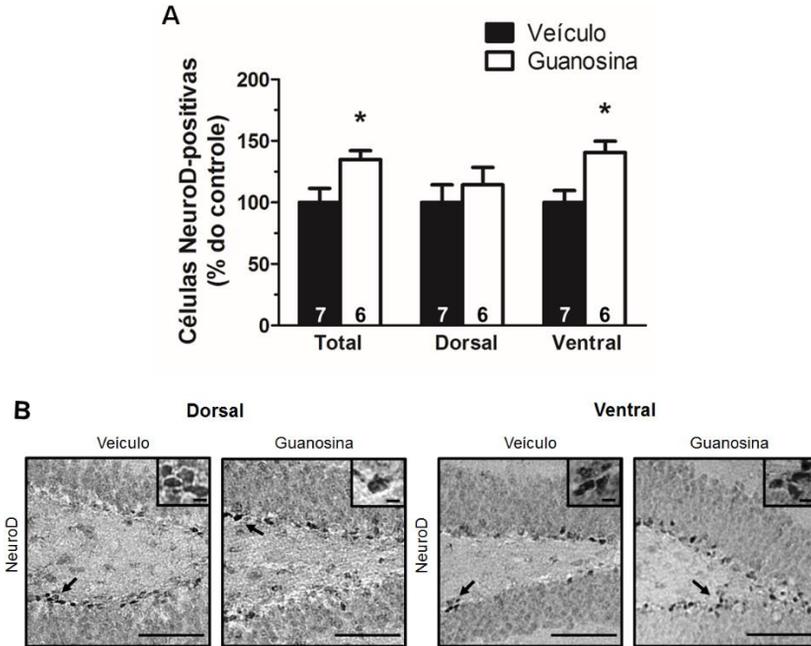
Figura 8. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina na diferenciação neuronal avaliada por imunohistoquímica para NeuroD



Legenda: Não foi encontrada diferença significativa no número de células NeuroD-positivas entre os camundongos tratados com veículo ou fluoxetina (10 mg/kg, p.o.), tanto no GD inteiro, quanto em seus aspectos dorsal e ventral. Os valores estão representados como média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras (A). Fotomicrografias representativas dos efeitos do tratamento crônico com veículo ou fluoxetina na expressão do marcador endógeno de diferenciação neuronal NeuroD (indicado pelas setas) magnificadas em 10 x (barra de escala = 100 μ m) e 40 x (barra de escala = 10 μ m) no GD do hipocampo ventral (B).

O tratamento crônico com guanosina (5 mg/kg, p.o.), por sua vez, revelou um aumento significativo no número de neurônios imaturos NeuroD-positivos presentes na ZSG do hipocampo inteiro ($p < 0,05$), assim como na porção ventral dessa estrutura ($p < 0,05$). Entretanto nenhuma alteração significativa foi encontrada na ZSG dorsal do hipocampo ($p = 0,50$) (Figura 9).

Figura 9. Efeito do tratamento crônico com guanosina na diferenciação neuronal avaliada por imunohistoquímica para NeuroD

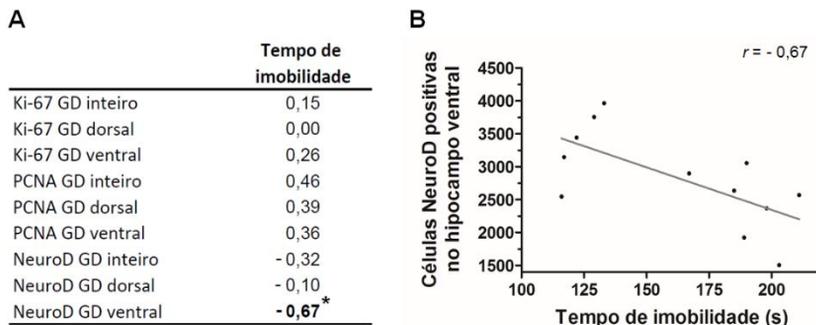


Legenda: Um aumento significativo no número de células NeuroD-positivas foi observado no giro denteado (GD) total de camundongos tratados com guanosina. Análises adicionais revelaram que não houve alteração na diferenciação neuronal na porção dorsal do GD, entretanto, um aumento específico no número de neuroblastos NeuroD-positivos foi detectado na porção ventral dessa estrutura. Os valores estão representados como média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras (A). Fotomicrografias representativas dos efeitos do tratamento crônico com veículo ou guanosina na expressão do marcador endógeno de diferenciação neuronal NeuroD (indicado pelas setas) magnificadas em 20 x (barra de escala = 50 μ m) e 40 x (barra de escala = 10 μ m) nos GDs dorsal e ventral (B). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo (teste *t* de Student).

Cabe ressaltar que o teste de Pearson revelou uma correlação negativa entre o tempo de imobilidade no TSC e o número de células NeuroD-positivas na região ventral do GD ($r = -0,67$; $p < 0,05$; Figura 10),

reforçando a hipótese de que o efeito tipo-antidepressivo ocasionado pelo tratamento crônico com guanosina possa estar relacionado, pelo menos em parte, a um aumento na diferenciação neuronal na região ventral do GD hipocampal.

Figura 10. Correlação estatística entre o tempo de imobilidade no TSC e resultados imunohistoquímicos



Legenda: Correlação estatística entre o tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC) e o número de células Ki-67-, PCNA- e NeuroD-*immunopositivas* nos GDs inteiro, dorsal e ventral de camundongos submetidos a tratamento crônico com guanosina. As correlações (valores de *r*) foram calculadas através do teste de correlação de Pearson (A). Diagrama de dispersão do tempo de imobilidade no TSC em função do número total de células NeuroD-positivas presentes no GD ventral (B).

3. Discussão

A observação de que o hipocampo desempenha um papel-chave na memória e regulação do humor, levou a constatação de que as alterações na neurogênese do hipocampo adulto apresentam um papel importante na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos (DENG; AIMONE; GAGE, 2010; EISCH et al., 2008). De fato, diversos estudos têm demonstrado que a redução na proliferação celular e/ou diferenciação neuronal induzida pelo estresse está relacionada com o desenvolvimento de sintomas depressivos (CZÉH et al., 2001; MCEWEN; MAGARINOS, 2001; SAPOLSKY, 2000) e que, fármacos antidepressivos possuem propriedades neurogênicas (DUMAN; NAKAGAWA; MALBERG, 2001; MANEV et al., 2001). Nesse contexto, foi proposta a teoria neurogênica da depressão (JACOBS; VAN PRAAG; GAGE, 2000; KEMPERMANN; KRONENBERG, 2003). Essa ideia foi reforçada pela observação de que pacientes depressivos

apresentam alterações morfológicas no hipocampo, incluindo uma atrofia significativa nessa região encefálica, a qual pode ser revertida por intervenções terapêuticas (BOLDRINI et al., 2009; COLE et al., 2011; ERICKSON et al., 2011; NORDANSKOG et al., 2010). É também bem estabelecido que o estresse crônico (um fator de risco para a depressão) leva a uma redução na neurogênese hipocampal e que, terapias com atividade antidepressiva são capazes de reverter esse déficit (DRANOVSKY; HEN, 2006; SURGET et al., 2011; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2007). Além disso, o fato de que o tempo de maturação de neurônios nascidos no cérebro adulto é similar ao efeito tardio característico de antidepressivos convencionais oferece suporte a essa hipótese (EISCH; PETRIK, 2012; SAHAY; HEN, 2007). Entretanto, ainda não está claro se todos os compostos antidepressivos possuem propriedades neurogênicas e, algumas evidências sugerem que a atividade de vários compostos com efeito antidepressivo bem conhecido pode ser mediada também por mecanismos neurogênese-independentes (BESSA et al., 2009; DAVID et al., 2009; MESHI et al., 2006).

No Capítulo 1 do presente trabalho foi demonstrado que a guanosina previne alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo EC no hipocampo de camundongos. Uma vez que um aumento na proliferação celular hipocampal e/ou diferenciação neuronal é uma característica comum do tratamento crônico com diversos antidepressivos (BJØRNEBEKK; MATHÉ; BRENÉ, 2005; MANEV et al., 2001), no presente estudo, os efeitos do tratamento crônico com guanosina em camundongos submetidos ao TSC e seus efeitos na proliferação celular e diferenciação neuronal foram investigados no hipocampo. Considerando que em estudo anterior foi encontrado um *plateau* no qual doses mais elevadas de guanosina possuem um efeito similar em seu efeito tipo-antidepressivo em comparação a doses menores (0,05 a 5 mg/kg) (BETTIO et al., 2012), no presente trabalho foi escolhida a dose mais próxima daquelas reportadas como neuroprotetora e neurotrófica em diversos estudos *in vivo* (doses de 7,5 ou 8 mg/kg) (CHANG et al., 2008; SU et al., 2009; TAVARES et al., 2005). Corroborando achados de estudo prévio (BETTIO et al., 2012), assim como os reportados no Capítulo 1, foi constatado que o tratamento crônico com guanosina (5 mg/kg; 21 dias) possui de fato atividade tipo-antidepressiva. Cabe ressaltar que desta vez, os testes comportamentais foram conduzidos 24 h após a última administração e portanto, deve-se considerar a possibilidade de que os mecanismos que mediam os efeitos tipo-antidepressivo dos tratamentos agudo e crônico exercidos pela guanosina sejam distintos. Mesmo assim, no presente estudo foi demonstrado que o efeito do tratamento crônico com

guanosina no tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao TSC foi similar ao obtido com o antidepressivo clássico fluoxetina (controle positivo).

Entretanto, os efeitos da guanosina e da fluoxetina parecem não ser os mesmos com relação a proliferação celular hipocampal. De fato, ao passo em que foi encontrado um aumento na proliferação celular induzido pelo tratamento crônico com fluoxetina, uma abordagem similar com guanosina não demonstrou efeito na proliferação celular avaliada por imunohistoquímica para os marcadores endógenos Ki-67 e PCNA. Embora estudos prévios tenham demonstrado efeitos proliferativos induzidos pela administração sistêmica de guanosina em condições de insulto (JIANG et al., 2003, 2008b; SU et al., 2009), esse é o primeiro trabalho em que esse efeito foi avaliado no GD hipocampal. Uma vez que em estudo prévio foi demonstrado que o tratamento crônico com 8 mg/kg de guanosina ocasionou um aumento na proliferação celular e diferenciação neuronal na ZSV e substância negra (SU et al., 2009), é possível que alterações mais relevantes na proliferação celular e diferenciação neuronal possam ser observadas no GD hipocampal com doses de guanosina mais elevadas do que as utilizadas no presente trabalho. Sendo assim, novos estudos devem ser conduzidos para estabelecer uma curva dose-resposta dos efeitos desse nucleosídeo na proliferação celular do hipocampo (incluindo doses menores e maiores do que 5 mg/kg), como também para determinar se a guanosina também altera a proliferação celular hipocampal em condições de insulto. É digno de nota que, ao passo em que os efeitos proliferativos que seguem a administração de antidepressivos tenham sido propostos como um mecanismo crucial para a ocorrência de uma resposta antidepressiva (MALBERG et al., 2000; SANTARELLI et al., 2003), essa hipótese é atualmente bastante contestada (GORMAN; DOCHERTY, 2010; HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011; TANG; HELMESTE; LEONARD, 2012). De fato, alterações na dendritogênese e remodelamento sináptico são suficientes para ocasionar uma resposta antidepressiva (BESSA et al., 2009; BROWNE; LUCKI, 2013; GORMAN; DOCHERTY, 2010; LI et al., 2010) sendo que, mesmo com um aumento rápido na proliferação celular, os novos neurônios hipocampais gerados levariam semanas para ter um impacto funcional (ESPÓSITO et al., 2005; GE et al., 2008). Além disso, o fato de fármacos como a cetamina se mostrarem capazes de exercer um efeito antidepressivo rápido (LI et al., 2010, 2011), indica que um aumento na proliferação celular não é um mecanismo integral da atividade antidepressiva.

Curiosamente, no presente estudo a análise da imunohistoquímica para NeuroD revelou um aumento no número de neurônios imaturos em

diferenciação no GD hipocampal de camundongos tratados com guanosina. A especificação do destino de células tronco neurais pode ser ditada por pistas ambientais tais quais a liberação de fatores de diferenciação por astrócitos adjacentes (LIM; ALVAREZ-BUYLLA, 1999; NAKAYAMA; MOMOKI-SOGA; INOUE, 2003; SONG; STEVENS; GAGE, 2002). De fato, é bem estabelecida a capacidade que a guanosina tem de estimular a liberação astrocitária de fatores de crescimento envolvidos na regulação da diferenciação neuronal tais quais o NGF, BDNF e o TGF β 1 (DI IORIO et al., 2001; MIDDLEMISS; GYSBERS; RATHBONE, 1995; NOUREDDINI et al., 2012; RATHBONE et al., 2008; SU et al., 2013; VOGEL et al., 2010). Sendo assim, futuros estudos devem ser conduzidos a fim de determinar o envolvimento de fatores de crescimento específicos na diferenciação neuronal induzida pela guanosina *in vivo*. Possivelmente, a modulação do suporte trófico exercida por essa molécula promoveu eventos bioquímicos envolvidos mais com a sobrevivência de neuroblastos do que com a estimulação da proliferação celular. De fato, apesar de ser bem estabelecido que esse nucleosídeo estimula a proliferação celular (CICCARELLI et al., 2000; RATHBONE et al., 1992; SU et al., 2013), existe também a possibilidade de que, tal qual ocorre com o efeito da guanosina sobre a captação de glutamato (FRIZZO et al., 2005), esses efeitos mitogênicos possam ser dependentes da presença de um insulto. Sendo assim, no presente trabalho (onde a neurogênese foi avaliada em condições basais), é plausível que a guanosina tenha favorecido a ativação de vias de sinalização pró-diferenciação e pró-sobrevivência, como por exemplo, através de suas conhecidas propriedades anti-apoptóticas (JIANG et al., 2007; SU et al., 2009), sem estimular a proliferação celular. Uma outra possibilidade pode ser a ocorrência de uma alteração na diferenciação de células tronco neurais, aumentando a formação do fenótipo neuronal e reduzindo o glial. Considerando que alterações na razão entre neurônios e células da glia podem causar um impacto em comportamentos hipocampo-dependentes (CHETTY et al., 2014) e que a guanosina promove a expressão de marcadores de diferenciação neuronal (GUARNIERI et al., 2009), é plausível que o aumento na imunomarcagem para NeuroD induzido pela guanosina no presente estudo tenha sido relacionada com uma alteração no padrão de diferenciação das células tronco hipocampais. Sendo assim, através da tripla marcação BrdU (bromodeoxiuridina; marcador de proliferação celular) / NeuN (proteína neuronal nuclear específica; marcador de maturação neuronal) / GFAP (proteína glial fibrilar ácida; marcador glial), futuros estudos devem elucidar se alterações nas razões BrdU/NeuN e BrdU/GFAP ocorrem como consequência do tratamento crônico com guanosina. Essa razão confirmará

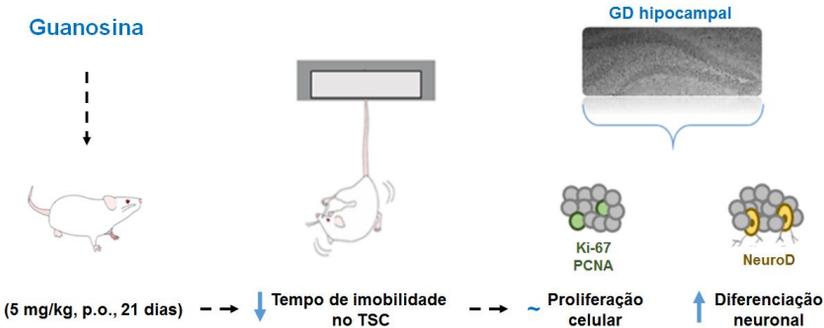
se o efeito da guanosina está de fato relacionado à estimulação da diferenciação das células tronco neurais para o fenótipo neuronal. Cabe ressaltar que esses resultados relativos à indução da diferenciação neuronal sem levar a alterações na proliferação celular são também suportados por um estudo que sugere que esse nucleosídeo participa da diferenciação neuronal, induzindo alterações genéticas envolvidas com o controle do ciclo celular, incluindo bloqueio do ciclo celular na fase S e expressão de marcadores de diferenciação neuronal (GUARNIERI et al., 2009).

É importante mencionar que, no presente trabalho, não foi encontrada uma alteração significativa no número de células NeuroD-positivas em camundongos tratados com fluoxetina. Embora um aumento na diferenciação neuronal tenha sido observado em alguns estudos após o tratamento crônico com fluoxetina (MALBERG et al., 2000; MARCUSSEN et al., 2008), existem também estudos demonstrando que a atividade tipo-antidepressiva desse fármaco pode ocorrer sem causar alterações na diferenciação neuronal (FERRÉS-COY et al., 2013; HUANG; BANNERMAN; FLINT, 2008). Apesar de os motivos responsáveis por essa discrepância não serem completamente compreendidos, eles possivelmente são relacionados a diferenças nas condições experimentais incluindo a dose de fluoxetina utilizada, a duração e frequência do tratamento, a idade dos animais no momento da análise, assim como os protocolos e marcadores endógenos usados para avaliação da diferenciação neuronal. Independente disso, o fato de no presente estudo a fluoxetina ter aumentado a proliferação celular no GD sem alterar a diferenciação neuronal, enquanto a guanosina não apresentou efeito na proliferação celular do GD mas levou a um aumento na diferenciação neuronal, indica que esses dois compostos com atividade tipo-antidepressiva modulam a neurogênese hipocampal através de mecanismos distintos.

É digno de nota que o hipocampo em geral e, o GD em particular, possuem diferentes padrões de expressão gênica e projeções anatômicas ao longo de seu eixo dorsal/ventral, sugerindo que diferentes sub-regiões hipocampais podem ser importantes para a modulação de funções distintas. De fato, diversas linhas de evidência têm indicado que, ao passo em que o hipocampo dorsal é especificamente envolvido no aprendizado espacial e memória, o hipocampo ventral regula processos afetivos e emocionais (FANSELOW; DONG, 2010; KHEIRBEK; HEN, 2011; MCHUGH et al., 2011; SAHAY; HEN, 2007). Sendo assim, tem sido demonstrado que os antidepressivos podem exercer seus efeitos aumentando a neurogênese especificamente no GD ventral (BANASR et al., 2006; FELICE et al., 2012; JAYATISSA et al., 2006; KHEIRBEK; HEN, 2011). Curiosamente,

no presente estudo o aumento na diferenciação neuronal observado após o tratamento crônico com guanosina ocorreu especificamente no GD ventral, sendo que nenhuma diferença no número de neuroblastos imaturos NeuroD-positivos foi detectado no GD dorsal. É digno de nota que essa alteração se mostrou negativamente correlacionada com o tempo de imobilidade dos camundongos no TSC, reforçando a ideia de que o hipocampo ventral desempenha um papel crucial na atividade tipo-antidepressiva da guanosina. Considerando que novos neurônios hipocampais podem levar mais que uma semana para se integrarem funcionalmente em circuitarias neurais pré-existentes (GE et al., 2008), é plausível que a redução no tempo de imobilidade encontrada após o tratamento crônico com guanosina tenha sido relacionada, pelo menos em parte, com alterações no funcionamento neuronal que ocorre com a integração de novos neurônios na circuitaria hipocampal.

Figura 11. Diagrama esquemático com os resultados referentes ao Capítulo 2



Legenda: O tratamento crônico com guanosina (5 mg/kg/dia; p.o.) por 21 dias ocasionou uma redução no tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (TSC). Apesar de nenhuma alteração ter sido encontrada na proliferação celular, um aumento na diferenciação neuronal foi observado no giro denteado (GD) ventral do hipocampo dos animais. Além disso, foi encontrada uma correlação negativa entre esse aumento e a redução no tempo de imobilidade no TSC.

Este capítulo originou o seguinte artigo:

BETTIO L. E. B.; NEIS, V. B.; PAZINI, F. L.; BROCARDO, P. S.; PATTEN, A. R.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R.; RODRIGUES, A. L. S. The antidepressant-like effect of chronic guanosine treatment is associated with increased hippocampal neuronal differentiation. **European Journal of Neuroscience** – In press. doi: 10.1111/ejn.13172.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA, FLUOXETINA E CETAMINA EM MODELOS DE ESTRESSE CRÔNICO

Embora os efeitos do estresse sejam uma experiência comum na vida cotidiana, a exposição crônica a estressores está implicada no surgimento de eventos patológicos, precipitando a ocorrência de transtornos de humor (KUMAR et al., 2013). É bem conhecido que o estresse desencadeia a ativação do eixo HPA, culminando na produção de GCs pelas adrenais. Esses hormônios são liberados diretamente no sistema circulatório periférico e atingem rapidamente a BHE (LI et al., 2012). O hipocampo possui uma alta densidade de receptores para glicocorticoides sendo, portanto, mais vulnerável a exposição crônica aos GCs, os quais podem causar alterações na plasticidade sináptica (MAGARIÑOS; VERDUGO; MCEWEN, 1997), redução na neurogênese (SCHOENFELD; GOULD, 2012) e morte neuronal (HAYNES; BARBER; MITCHELL, 2004).

Nesse contexto, sabe-se que a cetamina é capaz de reverter os efeitos deletérios do estresse através da modulação de vias de sinalização críticas para a sinaptogênese. O estudo das propriedades antidepressivas desse agente farmacológico indica que a capacidade de desencadear uma liberação rápida de fatores tróficos (particularmente o BDNF) leva a estimulação da mTOR e consequente síntese de proteínas sinápticas como a PSD-95, a sinapsina 1 e a subunidade GluA1 de receptores AMPA (LI et al., 2010, 2011; ZHOU et al., 2013). Levando em conta os efeitos da guanosina na modulação de fatores tróficos e na neuritogênese (RATHBONE et al., 2008) e a observação de que a inibição da mTOR é capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo desse nucleosídeo no TSC (BETTIO et al., 2012), o presente capítulo realizou uma análise comparativa da ação tipo-antidepressiva da guanosina com a de um antidepressivo de resposta lenta (fluoxetina) e um de ação rápida (cetamina) em animais submetidos a modelos de estresse crônico. A proposta deste estudo é verificar as similaridades e/ou diferenças no comportamento e imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica (BDNF, mTOR, PSD-95 e sinapsina 1) em camundongos tratados com uma dose única de guanosina, fluoxetina ou cetamina submetidos ao ECI ou ao modelo de estresse induzido por corticosterona. O presente capítulo encontra-se em etapa inicial, sendo que os protocolos de estresse foram conduzidos e a avaliação comportamental realizada. Amostras de sangue foram armazenadas para posterior análise dos níveis de corticosterona. Além disso, os animais tiveram os

hipocampos removidos para que possíveis alterações em vias de sinalização relacionadas a plasticidade neural sejam comparadas.

1. Materiais e métodos

1.1. Animais

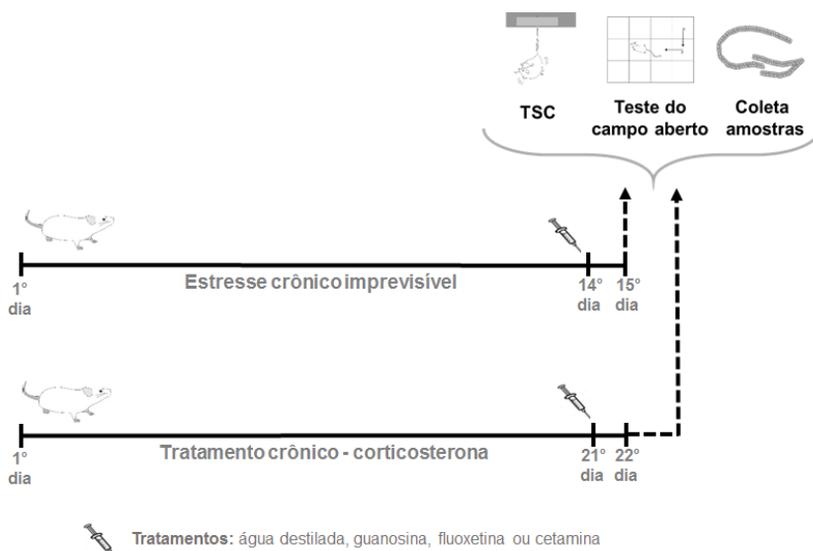
Camundongos Swiss fêmeas (35-45 g), mantidos a 20-22 °C com acesso livre à água e comida submetidos a um ciclo claro/escuro de 12:12 h (luzes acesas às 7:00) foram utilizados (7-10 animais por grupo). Os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00 e 17:00 h e todos os esforços feitos para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° 00795).

1.2. Agentes farmacológicos e tratamentos

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas: corticosterona, cetamina, fluoxetina e guanosina (Sigma Chemical Co, EUA). Guanosina e fluoxetina foram diluídas em água destilada e a corticosterona em água destilada com 2% de Tween 80 e 0,2% de DMSO, sendo todas administradas por via oral. A diluição da cetamina foi feita em solução salina e administrada por via intraperitoneal, devido a sua baixa disponibilidade quando administrada por via oral (CHONG et al., 2006; IRWIN et al., 2013). Os animais controle foram tratados com o veículo apropriado. Todas as administrações foram realizadas em um volume de 10 ml/kg entre 9:00 e 10:00 h, sendo que comida e água foram retirados uma hora antes do início dos tratamentos.

A fim de comparar os efeitos da guanosina com diferentes classes de antidepressivos no modelo de ECI ou no modelo de estresse induzido pela administração de corticosterona, os animais foram tratados com dose única de guanosina (5 mg/kg, p.o.), fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) ou cetamina (1 mg/kg, i.p.) 24 h antes da submissão aos testes comportamentais e eutanásia (Figura 1). A dose de guanosina foi escolhida com base nos resultados obtidos no Capítulo 1 ao passo em que a de fluoxetina e cetamina foram baseadas em estudos prévios (MORETTI et al., 2012; PAZINI et al., 2015). Os camundongos foram mantidos em grupos de 12 animais por caixa. Os seguintes grupos experimentais foram avaliados: (1) não-estressados + veículo; (2) não-estressados + guanosina; (3) não-estressados + fluoxetina; (4) não-estressados + cetamina; (5) estressados + veículo; (6) estressados + guanosina; (7) estressados + fluoxetina e (8) estressados + cetamina.

Figura 1. Diagrama dos procedimentos experimentais



Legenda: Os protocolos experimentais foram conduzidos a fim de comparar os efeitos da administração de guanosina (5 mg/kg, p.o.), fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) e cetamina (1 mg/kg, i.p.) frente a dois modelos de estresse: o estresse crônico imprevisível (14 dias) e o estresse induzido por tratamento crônico com corticosterona (21 dias; p.o.). Os agentes farmacológicos a serem investigados foram administrados no último dia de cada protocolo e, após 24 h, os animais foram avaliados no teste de suspensão pela cauda (TSC) e no teste do campo aberto. Após a realização dos testes comportamentais, foram coletadas amostras de sangue e hipocampo dos camundongos.

1.3. Protocolos de estresse

1.3.1. Estresse crônico imprevisível (ECI)

O protocolo de ECI consistiu em uma variedade de estressores aplicados de forma aleatória em períodos de tempo variados durante 14 dias (Tabela 1), conforme previamente descrito (LU et al., 2006; MORETTI et al., 2012). Os animais do grupo controle foram mantidos em câmaras separadas dos animais estressados a fim de evitar interferências relacionadas ao odor e vocalização ultrassônica relacionados ao estresse.

Durante os 14 dias do protocolo, os animais controle permaneceram em suas caixas nas condições padrão previamente descritas (seção 1.1). No último dia do protocolo, os animais receberam uma administração de veículo, guanosina, fluoxetina ou cetamina e, após 24 h foram realizados os testes comportamentais e coletadas as amostras de sangue e hipocampo.

Tabela 1. Cronograma dos agentes estressores utilizados no protocolo de estresse crônico imprevisível

Dia	Agente estressor	Duração	Horário
1	Confinamento	1,5 h	14:00
2	Banho frio (15 °C)	5 min	9:30
3	Maravalha molhada / caixa inclinada (45°)	24 h	10:30
4	Confinamento frio (8 °C)	7 min	18:30
5	Prendedor na cauda	10 min	12:30
6	Nado forçado	6 min	14:00
7	Confinamento	1,5 h	9:30
8	Choque (0,7 mA - 0,5 s/min)	3 min	8:30
9	Banho frio (15 °C)	5 min	16:30
10	Maravalha molhada / caixa inclinada (45°)	24 h	12:30
11	Choque (0,7 mA - 0,5 s/min)	3 min	18:30
12	Confinamento frio (8 °C)	7 min	14:30
13	Prendedor na cauda	10 min	9:00
14	Choque (0,7 mA - 0,5 s/min)	3 min	13:00

Para realização dos protocolos de confinamento, os animais foram colocados em dispositivos individuais feitos de Plexiglas fenestrado ao passo em que, para a realização dos estressores do nado forçado e banho frio foram colocados em um recipiente cilíndrico (diâmetro 10 cm, altura 25 cm) contendo 19 cm de água. O estressor de maravalha molhada foi conduzido mediante exposição dos camundongos a um ambiente com substrato úmido (400 ml de água) mantido em uma inclinação de 45°.

O choque nas patas foi aplicado dentro de um aparato que consiste em uma caixa plástica (50 x 25 x 25 cm) com uma parede de vidro dianteira. O piso do aparelho consiste de barras paralelas de 10 mm onde os camundongos foram colocados. Os choques foram aplicados de forma aleatória (0,7 mA; 0,5 s/min) durante 3 minutos.

A compressão da cauda foi aplicada usando um prendedor de roupas a 1 cm da base da cauda dos animais.

1.3.2. Modelo de estresse induzido por corticosterona

Um problema em potencial no uso de estressores aplicados pelo experimentador é a falta de controle sobre as diferenças individuais na ativação do eixo HPA e subsequentes níveis de corticosterona. Isso pode resultar em alterações distintas nos níveis desse GC em roedores expostos ao mesmo estressor, consequentemente causando uma variabilidade experimental. Uma forma de evitar esse problema é através da administração crônica de corticosterona como um meio de estudar os efeitos de níveis elevados desse hormônio (GREGUS et al., 2005; JESBERGER; RICHARDSON, 1985). Cabe ressaltar ainda que a exposição ao estresse induzido pelo tratamento crônico com corticosterona pode levar a diferentes alterações na expressão de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica em comparação com o estresse comportamental (NACHER et al., 2004).

Nesse contexto, a fim de melhor avaliar os efeitos da administração de uma dose de guanosina, fluoxetina ou cetamina no comportamento e imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica, um grupo a parte de animais foi submetido ao protocolo de estresse induzido pela corticosterona, o qual consistiu na administração de uma dose diária de corticosterona (20 mg/kg, p.o.) durante 21 dias, conforme previamente descrito (ROSA et al., 2014). Os animais do grupo controle foram mantidos em câmaras separadas dos animais tratados com corticosterona.

1.4. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

O tempo de imobilidade dos animais foi avaliado no TSC durante um período de 6 minutos conforme descrito no Capítulo 2 (seção 1.3) do presente trabalho.

1.5. Teste do campo aberto

Os camundongos foram avaliados no teste do campo aberto a fim de descartar alterações na atividade locomotora como uma possível interferência na interpretação dos resultados obtidos no TSC (BETTIO et al., 2012; MORETTI et al., 2012). O teste foi realizado conforme descrito no Capítulo 1 (seção 1.4) do presente trabalho.

1.6. Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan. Os efeitos principais das variáveis tratamento e estresse foram apresentados apenas quando a interação entre as variáveis não foi significativa. Os dados foram

apresentados nas figuras como média + EPM. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

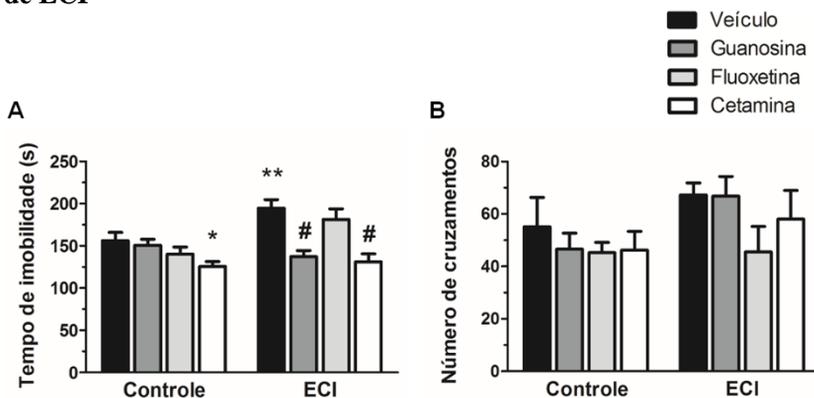
2. Resultados

2.1. Comparação entre os efeitos da guanosina, fluoxetina e cetamina no comportamento tipo-depressivo induzido por modelos de estresse

A fim de comparar o efeito tipo-antidepressivo da guanosina com o efeito de um antidepressivo clássico e de um antidepressivo de ação rápida, os animais foram submetidos ao protocolo de ECI e tratados com veículo, guanosina, fluoxetina ou cetamina, 24 h antes de serem avaliados no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para a interação ECI x tratamentos [$F_{(3,59)}=4,25$; $p < 0,01$]. Como demonstrado na Figura 2A, a exposição ao ECI aumentou significativamente o tempo de imobilidade dos animais no TSC em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Esse aumento foi revertido pelos tratamentos com guanosina e cetamina (ambos $p < 0,01$), mas não com fluoxetina. Cabe ressaltar que apenas o tratamento com cetamina ocasionou uma resposta tipo-antidepressiva em animais não submetidos ao ECI ($p < 0,01$).

A avaliação da atividade locomotora dos animais (Figura 2B) não revelou diferenças estatisticamente significativas para o ECI [$F_{(3,55)}=3,54$; $p=0,07$], tratamentos [$F_{(3,55)}=1,42$; $p=0,25$] e interação ECI x tratamentos [$F_{(3,55)}=0,39$; $p=0,76$].

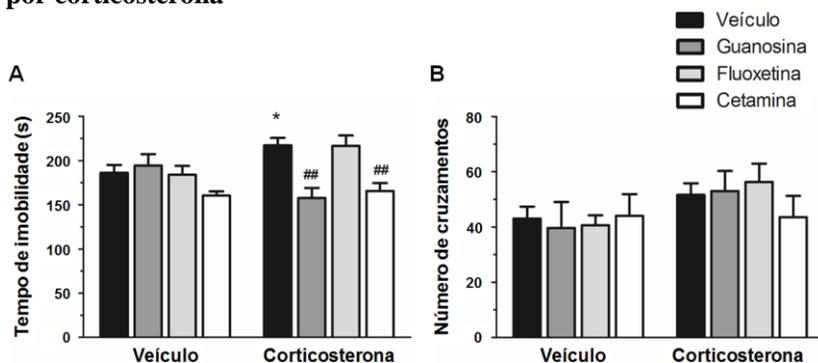
Figura 2. Efeito do tratamento agudo com guanosina, fluoxetina ou cetamina 24 h antes do TSC em camundongos submetidos ao protocolo de ECI



Legenda: Tempo de imobilidade e atividade locomotora de camundongos submetidos ao estresse crônico imprevisível (ECI) e/ou administrados com guanosina (5 mg/kg, p.o.), fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) ou cetamina (1 mg/kg, p.o.), 24 h antes de submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC) (A) e ao teste do campo aberto (B). Cada coluna representa a média + EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

Em uma outra série de experimentos, camundongos foram submetidos ao protocolo de estresse induzido pelo tratamento crônico com corticosterona, a fim de confirmar os efeitos observados no ECI e descartar a possibilidade do envolvimento de diferentes vias de sinalização em ambos os modelos. A ANOVA de duas vias revelou uma alteração significativa para a interação corticosterona x tratamentos [$F_{(3,61)}=5,41$; $p < 0,01$]. As análises *post-hoc* indicaram um aumento no tempo de imobilidade dos animais tratados com corticosterona ($p < 0,05$), o qual foi revertido pelo tratamento com guanosina e cetamina de forma similar ao observado no protocolo de ECI (ambos $p < 0,01$), mas não pela fluoxetina (Figura 3A). Nenhuma alteração significativa na atividade locomotora dos animais foi constatada como evidenciado pela ANOVA de duas vias para o estresse [$F_{(3,53)}=3,82$; $p=0,06$], tratamentos [$F_{(3,53)}=0,17$; $p=0,91$] e interação stress x tratamentos [$F_{(3,53)}=0,56$; $p=0,64$] (Figura 3B).

Figura 3. Efeito dos tratamentos com guanossina, fluoxetina ou cetamina em camundongos submetidos ao modelo de estresse induzido por corticosterona



Legenda: Os camundongos foram tratados por via oral com veículo ou corticosterona durante 21 dias sendo que, no último dia de tratamento receberam também uma dose de água, guanossina (5 mg/kg, p.o.), fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) ou cetamina (1 mg/kg, p.o.). Após 24 h, os animais foram submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC) (A) e ao teste do campo aberto (B). Cada coluna representa a média + EPM. O número de animais por grupo experimental está indicado nas respectivas barras. * $p < 0,05$, quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; ### $p < 0,05$ em comparação ao grupo estressado tratado com veículo.

3. Discussão

O presente capítulo apresentou dados preliminares de um trabalho em andamento que visa comparar o efeito da guanossina ao de um antidepressivo de ação lenta (fluoxetina) e ao de um agente farmacológico capaz de causar uma resposta antidepressiva rápida (cetamina). O aumento no tempo de imobilidade desencadeado por protocolos de estresse crônico está relacionado com os efeitos deletérios que esses modelos causam em neurônios hipocâmpais (SNYDER et al., 2011). Sendo assim, antidepressivos convencionais só são capazes de reverter esse déficit comportamental quando administrados de forma repetida, uma vez que esses compostos levam a alterações tróficas mediante vias de resposta lenta (ALFONSO; FRASCH; FLUGGE, 2005). Entretanto, antidepressivos que agem modulando o sistema glutamatérgico (particularmente os capazes de potenciar a atividade de receptores AMPA e/ou antagonistas de subunidade GluN2B de receptores NMDA) têm se

mostrado mais eficazes em reverter esse prejuízo causado pelo estresse. Isso se deve a capacidade desses agentes farmacológicos de desencadear uma resposta trófica rápida, liberando BDNF e estimulando a síntese de proteínas envolvidas no restabelecimento das sinapses prejudicadas pela exposição ao estresse (AKINFIRESOYE; TIZABI, 2013; LI et al., 2010, 2011).

No presente trabalho, tanto o modelo de ECI quanto o estresse induzido pela administração de corticosterona, ocasionaram um aumento no tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao TSC. A administração de fluoxetina 24 h antes do teste não foi capaz de reverter esse efeito ao passo em que, os animais tratados com cetamina e os tratados com guanossina apresentaram uma reversão no aumento do tempo de imobilidade induzido por ambos os modelos de estresse. Esses dados corroboram os achados da literatura acerca da capacidade da cetamina em reverter o comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico com uma única administração (LI et al., 2010, 2011) e indicam que, possivelmente a guanossina apresente algumas similaridades com esse efeito. Entretanto, uma vez que apenas a cetamina levou a uma redução no tempo de imobilidade dos animais não-estressados, é plausível que existam diferenças na modulação das cascatas de sinalização estimuladas por ambos os compostos. Além disso, a ausência de efeito tipo-antidepressivo no grupo controle administrado com guanossina sugere que, pelo menos no tempo experimental avaliado no presente capítulo, a ação antidepressiva desse nucleosídeo parece ser dependente da ocorrência de um estressor.

Sabe-se que a capacidade que a cetamina tem de reverter os déficits sinápticos induzidos pelo estresse crônico está relacionada com a síntese de proteínas sinápticas mediada pela atividade da mTOR. A sinalização que leva a essa modulação pode ser estimulada pela atividade de fatores de crescimento e ativação das vias da PI3K/Akt e MAPKs (DUMAN; VOLETI, 2012), os quais são eventos implicados nos efeitos biológicos desencadeados pela guanossina (RATHBONE et al., 2008). De fato, em estudo anterior foi demonstrado que a inibição da via da PI3K/Akt/mTOR é capaz de anular a ocorrência da atividade tipo-antidepressiva aguda induzida pela guanossina (BETTIO et al., 2012). Entretanto, tanto esse efeito agudo quanto os achados experimentais do Capítulo 1, demonstram uma resposta antidepressiva em animais não-estressados, ao passo em que o mesmo não foi observado no presente capítulo. Possivelmente isso esteja relacionado a ocorrência de uma resposta tempo-dependente, uma vez que no presente capítulo o teste foi realizado 24 h após a administração. Entretanto, os resultados sugerem

também que a presença de um estressor foi capaz de estimular a ativação dos mecanismos subjacentes aos efeitos biológicos da guanosina.

Esses dados possivelmente serão esclarecidos pela análise da quantificação de imunoconteúdo de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica (mTOR, BDNF, PSD-95 e sinapsina 1) no hipocampo dos animais avaliados no presente estudo. Cabe ressaltar também que, no Capítulo 1 foi demonstrado que o estresse desencadeou uma resposta aditiva com a guanosina na atividade da SOD, uma enzima cuja expressão pode ser mediada pela ativação de Nrf2 (BANNING et al., 2005). Esse fator de transcrição também está envolvido na expressão de HO-1 (MARTIN et al., 2004), uma enzima que possui um papel relevante para a ocorrência de efeitos neuritogênicos induzidos pela guanosina (BAU et al., 2005). Sendo assim, a investigação da participação desse mecanismo no presente trabalho vai elucidar se a ativação de Nrf2 e seus transcritos é um mecanismo essencial para o restabelecimento dos efeitos deletérios ocasionados pelo estresse no hipocampo dos animais avaliados no presente estudo.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu evidências de que a guanosina exerce um efeito neuroprotetor contra alterações bioquímicas e comportamentais induzidas pelo estresse. O pré-tratamento com esse nucleosídeo foi capaz de impedir que os animais expostos a uma situação de estresse agudo sofressem dano oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica e prevenindo as alterações em enzimas antioxidantes endógenas que ocorrem como resposta ao estresse oxidativo no hipocampo. Além disso, foi demonstrado também que a guanosina induz um aumento significativo na atividade da enzima SOD, indicando que o efeito neuroprotetor observado no presente estudo se deve, pelo menos em parte, a uma resposta antioxidante ocasionada por esse composto.

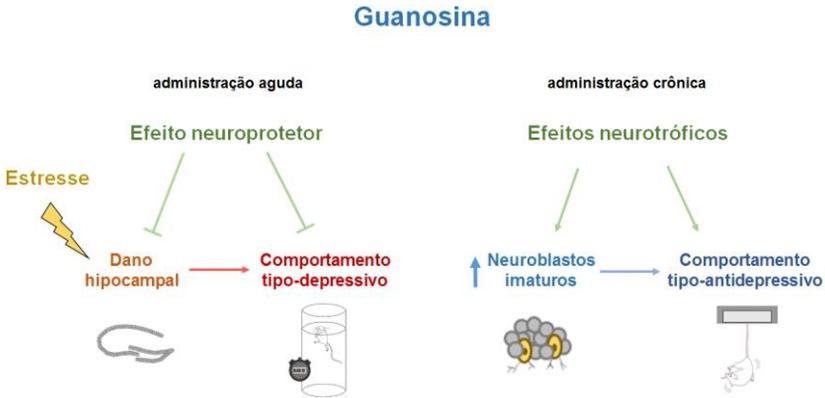
Considerando esses efeitos observados no hipocampo dos camundongos, o presente trabalho buscou em seguida verificar se os efeitos tróficos que esse nucleosídeo apresenta são capazes de causar alterações na proliferação celular e diferenciação neuronal característicos dessa estrutura. Foi constatado, pela primeira vez, que a guanosina é capaz de exercer uma influência sobre o processo neurogênico hipocampal, particularmente modulando aspectos que favorecem a diferenciação ou sobrevivência neuronais. Entretanto, futuros estudos ainda são necessários para esclarecer como esse processo ocorre na presença de um insulto ou de variações no protocolo experimental, tais quais diferentes doses e tempos de administração. É importante mencionar também que o presente estudo encontrou uma correlação positiva entre o aumento no número de neuroblastos imaturos no hipocampo ventral e o comportamento dos animais no TSC. Esse achado sugere que possivelmente essas células estejam sendo integradas na circuitaria hipocampal e contribuindo para a modulação de projeções neurais envolvidas com a modulação do humor.

Por fim, também foram fornecidas evidências preliminares de que a guanosina é capaz de reverter as alterações comportamentais induzidas por protocolos de estresse crônico no TSC. Entretanto, a análise comparativa do imunoconteúdo de diferentes proteínas envolvidas no processo de plasticidade neural no hipocampo desses animais avaliados ainda vai determinar os mecanismos que modulam esse efeito.

Em conjunto, os dados aqui presentes reforçam a hipótese de que a guanosina possui propriedades tipo-antidepressivas e fornece algumas evidências para os mecanismos envolvidos na resposta desencadeada por esse composto. Futuros estudos pré-clínicos acrescentarão mais detalhes a respeito de sua eficácia e alvos moleculares subjacentes a esses efeitos encontrados. A baixa toxicidade apresentada por esse nucleosídeo,

juntamente com a alta demanda por compostos capazes de aliviar os sintomas da depressão de forma eficaz, sugerem que a guanosina é um alvo interessante para futuros estudos que possam verificar o potencial terapêutico desse composto.

Figura 1. Resumo dos resultados obtidos



Legenda: Os resultados do presente trabalho indicam que a administração aguda de guanosina é capaz de exercer um efeito protetor contra os efeitos deletérios do estresse no hipocampo, prevenindo alterações neuroquímicas e comportamentais. Além disso, também foi constatado que o tratamento crônico com esse nucleosídeo leva a um aumento significativo no número de neuroblastos imaturos e que, essa alteração está diretamente relacionada com a ocorrência de um comportamento tipo-antidepressivo. *Fonte: Autor.*

5. PERSPECTIVAS

Capítulo 1:

- Verificar a capacidade da guanosina de prevenir a ocorrência de estresse oxidativo através da análise de biomarcadores adicionais (carbonilação de proteínas e danos ao DNA);
- Avaliar se a HO-1 exerce um papel no efeito protetor contra estresse oxidativo ocasionado pelo pré-tratamento com guanosina no EC
- Avaliar se a resposta antioxidante induzida pelo pré-tratamento com guanosina em animais expostos ao EC está relacionada a um aumento na transcrição gênica mediada por Nrf2;
- Verificar se o tratamento com guanosina em diferentes tempos após a submissão ao EC ainda é capaz de proteger os animais da ocorrência de comportamento tipo-depressivo e alterações nos parâmetros oxidantes/antioxidantes.

Capítulo 2:

- Verificar os efeitos do tratamento crônico com doses maiores e menores do que 5 mg/kg (curva dose-resposta) de guanosina sobre a proliferação celular e diferenciação neuronal no hipocampo de camundongos;
- Investigar o efeito do tratamento crônico com guanosina frente a modelos que causem prejuízo na neurogênese hipocampal (ex: estresse crônico) a fim de verificar se o efeito observado no presente trabalho varia na presença de um insulto;
- Avaliar os efeitos da guanosina sobre a sobrevivência celular através de protocolo específico utilizando BrdU;
- Realizar tripla marcação para confirmar se existem alterações nas razões BrdU/NeuN e BrdU/GFAP a fim de elucidar as causas do aumento no número de neuroblastos imaturos sem alterações na proliferação celular observado no presente estudo;

- Investigar o papel de fatores tróficos específicos (ex: BDNF, NGF, FGF-2, TGF- β 1) no tratamento crônico com guanosina a fim de verificar sua participação nos efeitos encontrados no presente trabalho.

Capítulo 3:

- Avaliar as alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona dos animais submetidos ao ECI e ao modelo de estresse induzido por corticosterona, assim como os efeitos dos tratamentos com guanosina, fluoxetina e cetamina sobre as concentrações desse hormônio;

- Comparar alterações no imunconteúdo de proteínas envolvidas com a ocorrência de plasticidade sináptica (BDNF, mTOR, PSD-95 e sinapsina 1) no hipocampo;

- Verificar a participação da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo da guanosina frente a modelos de estresse crônico.

REFERÊNCIAS

- ABOUL-FOTOUH, S. Coenzyme Q10 displays antidepressant-like activity with reduction of hippocampal oxidative/nitrosative DNA damage in chronically stressed rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 104, p. 105–12, 2013.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHMAD, A. et al. Brain region specific monoamine and oxidative changes during restraint stress. **The Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 39, n. 3, p. 311–8, 2012.
- AKINFIRESOYE, L.; TIZABI, Y. Antidepressant effects of AMPA and ketamine combination: Role of hippocampal BDNF, synapsin, and mTOR. **Psychopharmacology**, v. 230, n. 2, p. 291–298, 2013.
- ALFONSO, J.; FRASCH, A. C.; FLUGGE, G. Chronic stress, depression and antidepressants: effects on gene transcription in the hippocampus. **Reviews in the Neurosciences**, v. 16, n. 1, p. 43–56, 2005.
- ALMEIDA, O. F. et al. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 5, p. 779–790, 2000.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5th. ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013.
- ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. **GLIA**, v. 32, p. 1–14, 2000.
- ANDRADE, C.; RAO, N. S. K. How antidepressant drugs act: A primer on neuroplasticity as the eventual mediator of antidepressant efficacy. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 52, n. 4, p. 378–86, 2010.

ANGULO, E. et al. A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. **Brain Pathology**, v. 13, p. 440–451, 2003.

ARAQUE, A. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 5, p. 208–215, 1999.

AUTRY, A. E. et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 91–95, 2011.

BANASR, M. et al. Agomelatine, a New Antidepressant, Induces Regional Changes in Hippocampal Neurogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 11, p. 1087–1096, 2006.

BANASR, M. et al. Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 5, p. 501–11, 2010.

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004.

BANNING, A. et al. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, p. 4914–4923, 2005.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 3, p. 205–214, 2004.

BAU, C. et al. Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 161–172, 2005.

BEHR, G. A. et al. Increased cerebral oxidative damage and decreased antioxidant defenses in ovariectomized and sham-operated rats supplemented with vitamin A. **Cell Biology and Toxicology**, v. 28, p. 317–330, 2012.

BELLAVER, B. et al. Guanosine inhibits LPS-induced pro-inflammatory response and oxidative stress in hippocampal astrocytes through the heme oxygenase-1 pathway. **Purinergic Signalling**, v. 11, n. 4, p. 571–580, 2015.

BENNETT, M. R. The prefrontal-limbic network in depression: Modulation by hypothalamus, basal ganglia and midbrain. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 468–487, 2011.

BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351–354, 2000.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 137–151, 2006.

BESSA, J. M. et al. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. **Molecular Psychiatry**, v. 14, p. 764–773, 739, 2009.

BETTIO, L. E. B. et al. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behavioural Brain Research**, v. 234, n. 2, p. 137–148, 2012.

BETTIO, L. E. B. et al. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 7–14, dez. 2014.

BILBAN, M. et al. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 3, p. 267–279, 2008.

BILICI, M. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: Alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, n. 1, p. 43–51, 2001.

BJØRNEBEKK, A.; MATHÉ, A. A.; BRENE, S. The antidepressant effect of running is associated with increased hippocampal cell proliferation. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 357–368, 2005.

BOISON, D. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 2–7, 2008.

BOKOCH, M. P. et al. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 463, n. 7277, p. 108–112, 2010.

BOLDRINI, M. et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 11, p. 2376–2389, 2009.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 951–965, 1999.

BROWN, J. P. et al. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 1, p. 1–10, 2003.

BROWNE, C. A.; LUCKI, I. Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 161, 2013.

BRUNET, J. F.; GHYSEN, A. Deconstructing cell determination: proneural genes and neuronal identity. **BioEssays**, v. 21, n. 4, p. 313–318, 1999.

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

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews**, v. 24, n. 3, p. 509–81, 1972.

BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: **Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach**. New York: Raven Press, 1978. p. 107–118.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1471–1483, 2007.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 7, p. 575–590, 2008.

CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 2-3, p. 232–238, 2010.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CASTRÉN, E. Is mood chemistry? **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 6, p. 241–246, 2005.

CASTRÉN, E.; VÖIKAR, V.; RANTAMÄKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 18–21, 2007.

CHAN, K.; KAN, Y. W. Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 12731–12736, 1999.

CHANG, R. et al. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 431, n. 2, p. 101–105, 2008.

CHAOULOFF, F.; HÉMAR, A.; MANZONI, O. Acute stress facilitates hippocampal CA1 metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 27, p. 7130–7135, 2007.

CHETTY, S. et al. Stress and glucocorticoids promote oligodendrogenesis in the adult hippocampus. **Molecular Psychiatry**, v. 19, p. 1–9, 2014.

CHIZH, B. A. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: Review article. **Amino Acids**, v. 23, n. 1-3, p. 169–176, 2002.

CHONG, C. et al. Bioavailability of Ketamine After ORal or Sublingual Administration. **Pain Medicine**, v. 7, n. 5, p. 469, 2006.

CHOUDARY, P. V et al. Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15653–8, 2005.

CHRISTIE, B. R.; CAMERON, H. A. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 199–207, 2006.

CHROUSOS, G. P.; KINO, T. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 213–219, 2007.

CICCARELLI, R. et al. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. **Glia**, v. 25, n. 1, p. 93–98, 1999.

CICCARELLI, R. et al. Cultured astrocyte proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the Co-presence of microglia. **Glia**, v. 29, n. 3, p. 202–11, 2000.

CICCARELLI, R. et al. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 19, p. 395–414, 2001.

CLEVELAND, J. L.; KASTAN, M. B. Cancer. A radical approach to treatment. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 309–11, 2000.

COHEN-CORY, S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. **Science**, v. 298, p. 770–776, 2002.

COLE, J. et al. Hippocampal atrophy in first episode depression: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. **Journal of Affective Disorders**, v. 134, n. 1-3, p. 483–7, 2011.

CONNELL, B. J. et al. Guanosine protects against reperfusion injury in rat brains after ischemic stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, n. 2, p. 262–272, 2013.

CONTI, A. C. et al. cAMP response element-binding protein is essential for the upregulation of brain-derived neurotrophic factor transcription, but not the behavioral or endocrine responses to antidepressant drugs. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3262–3268, 2002.

COTTER, D. et al. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 58, p. 545–553, 2001.

COTTER, D. et al. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. **Cerebral Cortex**, v. 12, p. 386–394, 2002.

COVINGTON, H. E.; VIALOU, V.; NESTLER, E. J. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 4-5, p. 683–93, 2010.

CRANE, G. E. Iproniazid (marsilid) phosphate, a therapeutic agent for mental disorders and debilitating diseases. **Psychiatric Research Reports**, v. 8, p. 142–152, 1957.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 326–357, 2004.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 571–625, 2005.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 547–69, 2005.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 107–125, 2001.

CZÉH, B. et al. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 22, p. 12796–12801, 2001.

D'ALIMONTE, I. et al. Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 2, p. 720–731, 2007.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca(2)+-activated K+ channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. **Neuroscience**, v. 183, p. 212–220, 2011.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3beta pathway. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 3, p. 397–404, 2012.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, p. 437–450, 2013.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, p. 1–105, 2001.

DAVID, D. J. et al. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479–93, 2009.

DE CURTIS, I. Intracellular mechanisms for neuritogenesis. **Intracellular Mechanisms for Neuritogenesis**, p. 1–333, 2007.

DECKER, H. et al. Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 9, p. 1943–51, 2007.

DEDERT, E. A. et al. Posttraumatic stress disorder, cardiovascular, and metabolic disease: a review of the evidence. **Annals of Behavioral Medicine**, v. 39, n. 1, p. 61–78, 2010.

DÉGENÈTAIS, E. et al. Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. **Cerebral Cortex**, v. 13, n. 7, p. 782–792, 2003.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 339–350, 2010.

DERAMAUDT, T. B.; DILL, C.; BONAY, M. Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 3, p. 100–107, 2013.

DI IORIO, P. et al. Purine nucleosides protect injured neurons and stimulate neuronal regeneration by intracellular and membrane receptor-mediated mechanisms. **Drug Development Research**, v. 52, n. 1-2, p. 303–315, 2001.

DI IORIO, P. et al. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. **Glia**, v. 46, n. 4, p. 356–368, 2004.

DIAZGRANADOS, N. et al. Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 71, n. 12, p. 1605–1611, 2010.

DONG, X. X.; WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 4, p. 379–387, 2009.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1136–1143, 2006.

DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 240–249, 2001.

DUMAN, D.; HENINGER, H.; ERIC, N. A Molecular and Cellular Theory of Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597–606, 1997.

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

DUMAN, R. S. Neuronal damage and protection in the pathophysiology and treatment of psychiatric illness: Stress and depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 239–255, 2009.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006.

DUMAN, R. S.; NAKAGAWA, S.; MALBERG, J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 836–844, 2001.

DUMAN, R. S.; VOLETI, B. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: Novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 47–56, 2012.

DUNWIDDIE, T. V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31–55, 2001.

DWIVEDI, Y. et al. Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. **Journal of Neurochemistry**, v. 77, n. 3, p. 916–928, 2001.

DWYER, J. M.; DUMAN, R. S. Activation of mammalian target of rapamycin and synaptogenesis: role in the actions of rapid-acting antidepressants. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1189–1198, 2013.

EHNINGER, D.; KEMPERMANN, G. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 331, n. 1, p. 243-250, 2008.

EISCH, A. J. et al. Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 46, p. 11785–11791, 2008.

EISCH, A. J.; PETRIK, D. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? **Science**, v. 338, n. 6103, p. 72–5, 2012.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, p. 70–77, 1959.

ELSAYED, M. et al. Antidepressant effects of fibroblast growth factor-2 in behavioral and cellular models of depression. **Biological Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 258–265, 2012.

ERICKSON, K. I. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 3017–3022, 2011.

ESPÓSITO, M. S. et al. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 44, p. 10074–10086, 2005.

EVANS, D. L. et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. **Biological Psychiatry**, v. 58, n. 3, p. 175–189, 2005.

FAN, J. et al. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 53, n. 10, p. 6541–56, 2012.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.

FELICE, D. et al. Blockade of the GABAB receptor increases neurogenesis in the ventral but not dorsal adult hippocampus: Relevance to antidepressant action. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1380–1388, 2012.

FERRÉS-COY, A et al. RNAi-mediated serotonin transporter suppression rapidly increases serotonergic neurotransmission and hippocampal neurogenesis. **Translational Psychiatry**, v. 3, p. e211, 2013.

FIELDS, R. D.; BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, p. 423–436, 2006.

FONTELLA, F. U. et al. Repeated restraint stress induces oxidative damage in rat hippocampus. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 1, p. 105–111, 2005.

FORLENZA, M. J.; MILLER, G. E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. **Psychosomatic Medicine**, v. 68, n. 1, p. 1–7, 2006.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiology**, v. 155, p. 2–18, 2011.

FREDHOLM, B. B. et al. Adenosine and Brain Function. **International Review of Neurobiology**, v. 63, p. 191–270, 2005.

FREITAS, A. E. et al. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 50, p. 143–150, 2014.

FRIZZO, M. E. et al. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, p. 353–363, 2002.

FRIZZO, M. E. et al. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. **Brain Research**, v. 972, n. 1-2, p. 84–9, 2003.

FRIZZO, M. E. et al. Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, p. 913–921, 2005.

FRODL, T. et al. Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 7, p. 1112–1118, 2002.

GALECKI, P. et al. Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients. **Human Psychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 277–286, 2009.

GANZELLA, M. et al. Effects of chronic guanosine treatment on hippocampal damage and cognitive impairment of rats submitted to chronic cerebral hypoperfusion. **Neurological Sciences**, v. 33, n. 5, p. 985–997, 2012.

GARDNER, A. et al. Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. **Journal of Affective Disorders**, v. 76, n. 1-3, p. 55–68, 2003.

GAWRYLUK, J. W. et al. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 123–30, 2011.

GE, S. et al. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. **Neuron**, v. 54, n. 4, p. 559–66, 2007.

GE, S. et al. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 16, p. 3759–3765, 2008.

GIULIANI, P. et al. Tissue distribution and metabolism of guanosine in rats following intraperitoneal injection. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 26, n. 1, p. 51–65, 2012a.

GIULIANI, P. et al. Protective activity of guanosine in an in vitro model of Parkinson's disease. **Panminerva Medica**, v. 54, p. 43–51, 2012b.

GIULIANI, P. et al. **Guanosine protects glial cells against 6-hydroxydopamine toxicity**. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 837

GODSIL, B. P. et al. The hippocampal-prefrontal pathway: The weak link in psychiatric disorders? **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 10, p. 1165–1181, 2013.

GOMES, C. V et al. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 1380–1399, 2011.

GONG, Y. et al. Chronic mild stress damages mitochondrial ultrastructure and function in mouse brain. **Neuroscience Letters**, v. 488, n. 1, p. 76–80, 2011.

GORMAN, J. M.; DOCHERTY, J. P. A hypothesized role for dendritic remodeling in the etiology of mood and anxiety disorders. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 22, n. 3, p. 256–264, 2010.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 323–354, 2010.

GREEN, R. C. et al. Depression as a risk factor for Alzheimer disease: the MIRAGE Study. **Archives of Neurology**, v. 60, p. 753–759, 2003.

GREENE, L. A; TISCHLER, A S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 7, p. 2424–2428, 1976.

GREGUS, A. et al. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 105–114, 2005.

GROENEWEG, F. L. et al. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. **The Journal of Endocrinology**, v. 209, n. 2, p. 153–167, 2011.

GRØNLI, J. et al. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 842–849, 2006.

GUARNIERI, S. et al. Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 2, p. 135–147, 2009.

GYSBERS, J. W.; RATHBONE, M. P. Neurite outgrowth in PC12 cells is enhanced by guanosine through both cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Neuroscience Letters**, v. 220, p. 175–178, 1996.

HALASSA, M. M.; FELLIN, T.; HAYDON, P. G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 2, p. 54–63, 2007.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147–1150, 2007.

HANSEL, G. et al. The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. **PloS ONE**, v. 9, n. 2, p. e90693, 2014a.

HANSEL, G. et al. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 3, p. 1791–1803, 2014b.

HANSON, N. D.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Depression, Antidepressants, and Neurogenesis: A Critical Reappraisal. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 13, p. 2589–602, dez. 2011.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 682–696, 2010.

HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 405–414, 2002.

HARRISON, P. J. The neuropathology of primary mood disorder. **Brain**, v. 125, p. 1428–1449, 2002.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 7, p. 1558–1568, 2011.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 33–39, 2004.

HASLER, G. et al. Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1765–1781, 2004.

HAYNES, L. E.; BARBER, D.; MITCHELL, I. J. Chronic antidepressant medication attenuates dexamethasone-induced neuronal death and sublethal neuronal damage in the hippocampus and striatum. **Brain Research**, v. 1026, n. 2, p. 157–67, 2004.

HERKEN, H. et al. Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase, and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment. **Archives of Medical Research**, v. 38, n. 2, p. 247–252, 2007.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J. M. et al. Oxidation of biomolecules in the apoptotic death of cerebellar granule neurons induced by potassium deprivation. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 677–685, 2011.

HIRSCHFELD, R. M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 61 Suppl 6, p. 4–6, 2000.

HSIEH, J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. **Genes & development**, v. 26, n. 10, p. 1010–1021, 2012.

HSIEH, J. et al. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 47, p. 16659–16664, 2004.

HU, B.; NIKOLAKOPOULOU, A. M.; COHEN-CORY, S. BDNF stabilizes synapses and maintains the structural complexity of optic axons in vivo. **Development**, v. 132, p. 4285–4298, 2005.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.

HUANG, G.-J.; BANNERMAN, D.; FLINT, J. Chronic fluoxetine treatment alters behavior, but not adult hippocampal neurogenesis, in BALB/cJ mice. **Molecular Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 119–21, 2008.

HUANG, T. T.; ZOU, Y.; CORNIOLA, R. Oxidative stress and adult neurogenesis-Effects of radiation and superoxide dismutase deficiency. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, p. 738–744, 2012.

HUANG, Y. H.; BERGLES, D. E. Glutamate transporters bring competition to the synapse. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 14, n. 3, p. 346–352, 2004.

IRIE, M.; MIYATA, M.; KASAI, H. Depression and possible cancer risk due to oxidative DNA damage. **Journal of Psychiatric Research**, v. 39, n. 6, p. 553–60, 2005.

IRWIN, S. A et al. Daily oral ketamine for the treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care: a 28-day open-label proof-of-concept trial. **Journal of Palliative Medicine**, v. 16, n. 8, p. 958–65, 2013.

IRWIN, S. A.; IGLEWICZ, A. Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. **Journal of Palliative Medicine**, v. 13, n. 7, p. 903–908, 2010.

ISHIKAWA, A.; NAKAMURA, S. Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 31, p. 9987–9995, 2003.

ISOMETSA, E. Suicidal behaviour in mood disorders--who, when, and why? **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 59, n. 3, p. 120–130, 2014.

JACOBS, B. L.; VAN PRAAG, H.; GAGE, F. H. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. **Molecular Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. 262–269, 2000.

JACOBSON, K. A. et al. G protein-coupled adenosine (P1) and P2Y receptors: Ligand design and receptor interactions. **Purinergic Signalling**, v. 8, p. 419–436, 2012.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z.-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, p. 247–264, 2006.

JARVIS, M. F.; KHAKH, B. S. ATP-gated P2X cation-channels. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 208–215, 2009.

JAYATISSA, M. N. et al. Hippocampal cytotgenesis correlates to escitalopram-mediated recovery in a chronic mild stress rat model of depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 11, p. 2395–2404, 2006.

JENSTAD, M. et al. System a transporter SAT2 mediates replenishment of dendritic glutamate pools controlling retrograde signaling by glutamate. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. 5, p. 1092–1106, 2009.

JESBERGER, J. A.; RICHARDSON, J. S. Animal models of depression: Parallels and correlates to severe depression in humans. **Biological Psychiatry**, v. 20, n. 7, p. 764–784, 1985.

JIANG, S. et al. Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. **Neuroreport**, v. 14, n. 18, p. 2463–7, 2003.

JIANG, S. et al. Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 4, p. 411–21, 2007.

JIANG, S. et al. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, v. 27, p. 673–680, 2008a.

JIANG, S. et al. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. **Purinergic Signal**, v. 4, n. 1, p. 61–71, 2008b.

JOHNSON, J. A. et al. The Nrf2-ARE pathway: An indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, p. 61–69, 2008.

JOHNSTON, C. A.; SIDEROVSKI, D. P. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. **Molecular Pharmacology**, v. 72, p. 219–230, 2007.

JONES, K. W.; HAMMOND, J. R. Characterization of nucleoside transport activity in rabbit cortical synaptosomes. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 1733–1741, 1995.

JOURDI, H. et al. Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 27, p. 8688–8697, 2009.

KALARIA, R. N.; HARIK, S. I. Adenosine receptors and the nucleoside transporter in human brain vasculature. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 8, p. 32–39, 1988.

KALYNCHUK, L. E. et al. Corticosterone increases depression-like behavior, with some effects on predator odor-induced defensive behavior, in male and female rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 6, p. 1365–1377, 2004.

KAREGE, F. et al. Low Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biological Psychiatry**, v. 57, p. 1068–1072, 2005.

KASTER, M. P. et al. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: Evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. **Neuroscience Letters**, v. 355, p. 21–24, 2004.

KASTER, M. P. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 419–426, 2012.

KATZ, R. J.; ROTH, K. A.; CARROLL, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 247–251, 1981.

KEE, N. et al. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 115, n. 1, p. 97–105, 2002.

KELLER, M. B. et al. Optimizing outcomes in depression: focus on antidepressant compliance. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 17, n. 6, p. 265–271, 2002.

KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 499–503, 2003.

KESSLER, R. C. et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095–3105, 2003.

KESSLER, R. C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593–602, 2005.

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The epidemiology of depression across cultures. **Annual Review of Public Health**, v. 9, n. 34, p. 901–14, 2011.

KEW, J. N. C.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v. 179, p. 4–29, 2005.

KHALAJ, L. et al. Gemfibrozil pretreatment proved protection against acute restraint stress-induced changes in the male rats' hippocampus. **Brain Research**, v. 1527, p. 117–30, 2013.

KHANZODE, S. S. D. et al. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Report**, v. 8, p. 365–370, 2003.

KHEIRBEK, M. A.; HEN, R. Dorsal vs ventral hippocampal neurogenesis: implications for cognition and mood. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 373–4, jan. 2011.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 6, p. 453–462, 2002.

KIM, Y. K. et al. Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, p. 78–85, 2007.

KNAPP, R. J. et al. Antidepressant activity of memory-enhancing drugs in the reduction of submissive behavior model. **European Journal of Pharmacology**, v. 440, n. 1, p. 27–35, 2002.

KNOL, M. J. et al. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. **Diabetologia**, v. 49, n. 5, p. 837–845, 2006.

KODYDKOVÁ, J. et al. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 13-14, p. 1368–74, 2009.

KOTAN, V. O. et al. Effects of long-term antidepressant treatment on oxidative status in major depressive disorder: a 24-week follow-up study. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 5, p. 1284–1290, 2011.

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

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 11, p. 1305–1320, 2010.

KRYSTAL, J. H.; SANACORA, G.; DUMAN, R. S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: The path to ketamine and beyond. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1133–1141, 2013.

KUDRYASHOVA, I. V. Neurodegenerative changes in depression: Excitotoxicity or a deficit of trophic factors? **Neurochemical Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2015.

KUGAYA, A.; SANACORA, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. **CNS Spectrums**, v. 10, p. 808–819, 2005.

KUHN, R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). **American Journal of Psychiatry**, v. 115, n. 5, p. 459–464, 1958.

KUMAR, A. et al. Stress: Neurobiology, consequences and management. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 91–97, 2013.

KUMAR, A.; GARG, R.; PRAKASH, A. K. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) treatment on restraint stress-induced behavioral and biochemical alteration in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, p. 18, 2010.

LAGERSTRÖM, M. C.; SCHIÖTH, H. B. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 7, n. 4, p. 339–57, 2008.

LAJE, G. et al. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and antidepressant efficacy of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, v. 72, n. 11, p. e27–8, 2012.

LANG, U. E.; BORGWARDT, S. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 761–777, 2013.

LARA, D. R. et al. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. **Brain Research**, v. 912, n. 2, p. 176–180, 2001.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 463–484, 2001.

LAZAROV, O. et al. When neurogenesis encounters aging and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 12, p. 569–579, 2010.

LEE, S. J. S. Y. et al. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: Targets for novel antidepressants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 224–235, 2013.

LESHNER, A. I. et al. Desmethylimipramine (DMI) counteracts learned helplessness in rats. **Psychopharmacology**, v. 66, n. 2, p. 207–208, 1979.

LI, D.-W. et al. Guanosine exerts neuroprotective effects by reversing mitochondrial dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. - PubMed - NCBI. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 34, n. 5, p. 1358–1364, 2014.

LI, J. et al. Late gestational maternal serum cortisol is inversely associated with fetal brain growth. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 3, p. 1085–92, 2012.

LI, N. et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959–964, 2010.

LI, N. et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754–761, 2011.

LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 13, p. 7526–7531, 1999.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, p. 787–795, 2006.

LINDEN, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 775–787, 2001.

LIU, R. J. et al. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met allele impairs basal and ketamine-stimulated synaptogenesis in prefrontal cortex. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 11, p. 996–1005, 2012.

LOBATO, K. R. et al. α -Tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 2, p. 249–259, 2010.

LOONEY, J. M.; CHILDS, H. M. The lactic acid and glutathione content of the blood of schizophrenic patients. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 13, n. 6, p. 963–8, 1934.

LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. C. The global burden of disease, 1990-2020. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1241–1243, 1998.

LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 14, p. 1563–1586, 2009.

LOVATT, D. et al. Neuronal adenosine release, and not astrocytic ATP release, mediates feedback inhibition of excitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6265–70, 2012.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LOWY, M. T.; WITTENBERG, L.; YAMAMOTO, B. K. Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 65, n. 1, p. 268–74, 1995.

LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 434–445, 2009.

MACHADO-VIEIRA, R. et al. Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 123, n. 2, p. 143–150, 2009.

MACQUEEN, G.; FRODL, T. The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? **Molecular Psychiatry**, v. 16, p. 252–264, 2011.

MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676–692, 2011.

MAES, M. et al. New drug targets in depression: Inflammatory, cell-mediate immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. and new drug candidates-Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 127–50, 2012.

MAGARIÑOS, A M.; VERDUGO, J. M.; MCEWEN, B. S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 14002–14008, 1997.

MAILLY, F. et al. Increase in external glutamate and NMDA receptor activation contribute to H₂O₂-induced neuronal apoptosis. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 3, p. 1181–8, 1999.

MALARKEY, E. B.; PARPURA, V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 1-2, p. 142-154, 2008.

MALBERG, J. E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 9104–9110, 2000.

MANEV, H. et al. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 411, n. 1-2, p. 67–70, 2001.

MARCUSSEN, A. B. et al. Increase in neurogenesis and behavioural benefit after chronic fluoxetine treatment in Wistar rats. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 117, n. 6, p. 94–100, 2008.

MARTIN, D. et al. Regulation of Heme Oxygenase-1 Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and the Nrf2 Transcription Factor in Response to the Antioxidant Phytochemical Carnosol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 8919–8929, 2004.

MATTSON, M. P. Calcium and Free Radicals: Mediators of neurotrophic factor and excitatory transmitter-regulated developmental plasticity and cell death. **Perspectives on Developmental Neurobiology**, v. 3, p. 79–91, 1996.

MATTSON, M. P. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1144, p. 97–112, 2008.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 84, n. 3, p. 436–52, 2006.

MCEWEN, B. S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biological Psychiatry**, v. 48, p. 721–731, 2000.

MCEWEN, B. S. Protection and damage from acute and chronic stress: Allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, p. 1–7, 2004.

MCEWEN, B. S.; MAGARINOS, A. M. Stress and hippocampal plasticity: Implications for the pathophysiology of affective disorders. **Human Psychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 7–19, 2001.

MCHUGH, S. B. et al. Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 2, p. 322–337, 2011.

MCNALLY, L.; BHAGWAGAR, Z.; HANNESTAD, J. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. **CNS spectrums**, v. 13, n. 6, p. 501–510, 2008.

MÉNDEZ-CUESTA, L. A et al. Early changes in oxidative stress markers in a rat model of acute stress: effect of l-carnitine on the striatum. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 109, n. 2, p. 123–9, 2011.

MENDOZA, M. C.; ER, E. E.; BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 320–8, 2011.

- MENZA, M. et al. A controlled trial of antidepressants in patients with Parkinson disease and depression. **Neurology**, v. 72, p. 886–892, 2009.
- MESHI, D. et al. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 729–731, 2006.
- MICHALAKEAS, C. A et al. Effects of sertraline on circulating markers of oxidative stress in depressed patients with chronic heart failure: a pilot study. **Journal of Cardiac Failure**, v. 17, n. 9, p. 748–54, 2011.
- MIDDLEMISS, P. J.; GYSBERS, J. W.; RATHBONE, M. P. Extracellular guanosine and guanosine-5'-triphosphate increase: NGF synthesis and release from cultured mouse neopallial astrocytes. **Brain Research**, v. 677, n. 1, p. 152–6, 1995.
- MIGUEL-HIDALGO, J. J. et al. Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity. **Journal of Affective Disorders**, v. 127, n. 1-3, p. 230–40, 2010.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. Purification and Properties of Superoxide from a Red Alga , *Porphyridium cruentum* Dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 16, p. 6421–6423, 1977.
- MITSUBUKAWA, K. et al. Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes dysregulation of the HPA axis and increases hippocampal BDNF protein levels: implications for stress-related psychiatric disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 6, p. 1112–22, 2006.
- MIYATA, T.; MAEDA, T.; LEE, J. E. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. **Genes & Development**, v. 13, n. 13, p. 1647–52, 1 jul. 1999.
- MORETTI, M. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, p. 331–340, 2012.
- MORETTI, M. et al. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 49, p. 68–79, 2013.

MORETTO, M. B. et al. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. **Experimental Neurology**, v. 195, n. 2, p. 400–6, 2005.

MUKHERJEE, P. K. et al. Glutamate receptor signaling interplay modulates stress-sensitive mitogen-activated protein kinases and neuronal cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 10, p. 6493–6498, 1999.

MURAKAMI, S. et al. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. **Neuroscience Research**, v. 53, n. 2, p. 129–139, 2005.

MURROUGH, J. W. et al. Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. **American Journal of Psychiatry**, v. 170, n. 10, p. 1134–1142, 2013.

MUSAZZI, L. et al. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: The dampening action of antidepressants. **PLoS ONE**, v. 5, 2010.

MUSCOLI, C. et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 3, p. 445–460, 2003.

NACHER, J. et al. Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex. **Neuroscience**, v. 126, n. 2, p. 503–509, 2004.

NAGASAWA, K. et al. Characterization of guanine and guanosine transport in primary cultured rat cortical astrocytes and neurons. **Glia**, v. 55, n. 14, p. 1397–404, 1 nov. 2007.

NAKAYAMA, T.; MOMOKI-SOGA, T.; INOUE, N. Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. **Neuroscience Research**, v. 46, n. 2, p. 241–249, 2003.

NALIWAIKO, K. et al. Guanosine promotes B16F10 melanoma cell differentiation through PKC-ERK 1/2 pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 173, n. 2, p. 122–128, 2008.

NEARY, J. T. et al. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. **Trends in Neurosciences**, v. 19, p. 13–18, 1996.

NEIS, V. B. et al. Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 130, p. 9–14, 2015.

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

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. **Biological Psychiatry**, v. 59, p. 1151–1159, 2006.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–1169, 2010.

NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 2365–2372, 1996.

NICIU, M. J. et al. Second messenger/signal transduction pathways in major mood disorders: moving from membrane to mechanism of action, part I: major depressive disorder. **CNS Spectrums**, v. 18, n. 5, p. 231–241, 2013a.

NICIU, M. J. et al. Glutamate and its receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 8, p. 907–24, 2013b.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 656–664, 2012.

NORDANSKOG, P. et al. Increase in hippocampal volume after electroconvulsive therapy in patients with depression: a volumetric magnetic resonance imaging study. **Journal of ECT**, v. 26, n. 1, p. 62–7, 2010.

NOUREDDINI, M. et al. Human endometrial stem cell neurogenesis in response to NGF and bFGF. **Cell Biology International**, v. 36, n. 10, p. 961–966, 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.

OLESKOVICZ, S. P. et al. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 3, p. 411–418, 2008.

OLIVEIRA, D. L. DE et al. Quinolinic acid promotes seizures and decreases glutamate uptake in young rats: Reversal by orally administered guanosine. **Brain Research**, v. 1018, p. 48–54, 2004.

OTT, M. et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 913–922, 2007.

OVERSTREET-WADICHE, L. S.; WESTBROOK, G. L. Functional maturation of adult-generated granule cells. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 208–215, 2006.

OZCAN, M. E. et al. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 19, p. 89–95, 2004.

PALAZIDOU, E. The neurobiology of depression. **British Medical Bulletin**, v. 101, p. 127–145, 2012.

PARIANTE, C. M.; LIGHTMAN, S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends in Neurosciences**, v. 31, p. 464–468, 2008.

PASLAKIS, G.; BLUM, W. F.; DEUSCHLE, M. Intranasal insulin-like growth factor I (IGF-I) as a plausible future treatment of depression. **Medical Hypotheses**, v. 79, n. 2, p. 222–225, 2012.

PATIL, S. D.; UNADKAT, J. D. Sodium-dependent nucleoside transport in the human intestinal brush-border membrane. **The American Journal of Physiology**, v. 272, p. 1314–1320, 1997.

PAUL, I. A.; SKOLNICK, P. Glutamate and Depression: Clinical and Preclinical Studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1003, p. 250–272, 2003.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. **Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego, CA: Elsevier, 2001.

PAZINI, F. L. et al. Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. **Molecular Neurobiology**, p. 1–17, 2015.

PENG, L. et al. Nucleoside transporter expression and function in cultured mouse astrocytes. **Glia**, v. 52, n. 1, p. 25–35, 2005.

PETRONILHO, F. et al. Protective effects of guanosine against sepsis-induced damage in rat brain and cognitive impairment. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 6, p. 904–910, 2012.

PETTIFER, K. M. et al. Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced apoptosis. **Neuroreport**, v. 15, n. 5, p. 833–836, 2004.

PETTIFER, K. M. et al. MPP(+)-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. **Purinergic Signalling**, v. 3, n. 4, p. 399–409, 2007.

PETTY, F.; SHERMAN, A. D. Reversal of learned helplessness by imipramine. **Communications in Psychopharmacology**, v. 3, n. 5, p. 371–3, 1979.

PIET, R. et al. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2151–5, 2004.

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

POLESZAK, E. et al. Immobility stress induces depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 746–52, 2006.

POLLEUX, F.; SNIDER, W. Initiating and growing an axon. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 4, p. 1–20, 2010.

POMPELLA, A. et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1499–1503, 2003.

POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 22–37, 2012.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 229, p. 327–336, 1977.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neurocircuitry of mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 192–216, 2010.

QI, X. et al. A role for the extracellular signal-regulated kinase signal pathway in depressive-like behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 199, n. 2, p. 203–209, 2009.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Gliopreventive effects of guanosine against glucose deprivation in vitro. **Purinergic Signalling**, v. 9, p. 643–654, 2013.

QUINCOZES-SANTOS, A. et al. Guanosine protects C6 astroglial cells against azide-induced oxidative damage: a putative role for heme oxygenase 1. **Journal of Neurochemistry**, p. 61–74, 2014.

RAHN, K. A.; SLUSHER, B. S.; KAPLIN, A. I. Glutamate in CNS neurodegeneration and cognition and its regulation by GCPII inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 1335–45, 2012.

RAJKOWSKA, G.; STOCKMEIER, C. A. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. **Current Drug Targets**, v. 14, p. 1225–36, 2013.

RAMLACKHANSINGH, A. F. et al. Adenosine 2A receptor availability in dyskinetic and nondyskinetic patients with Parkinson disease. **Neurology**, v. 76, p. 1811–1816, 2011.

RATHBONE, M. et al. Neurotrophic effects of extracellular guanosine. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 27, n. 6, p. 666–672, 2008.

RATHBONE, M. P. et al. Extracellular guanosine increases astrocyte cAMP: inhibition by adenosine A2 antagonists. **Neuroreport**, v. 2, p. 661–664, 1991.

RATHBONE, M. P. et al. Extracellular purine nucleosides stimulate cell division and morphogenesis: pathological and physiological implications. **Medical Hypotheses**, v. 37, n. 4, p. 232–40, 1992.

RATHBONE, M. P. et al. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 663–690, 1999.

RATHBONE, M. P. et al. Systemic administration of guanosine promotes functional and histological improvement following an ischemic stroke in rats. **Brain Research**, v. 1407, p. 79–89, 2011.

REAGAN, L. P.; MCEWEN, B. S. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 13, n. 3, p. 149–67, 1997.

REDDY, M. S. Depression: the disorder and the burden. **Indian Journal of Psychological Medicine**, v. 32, n. 1, p. 1–2, 2010.

REUL, J. M. H. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505–2511, 1985.

REYNOLDS, I. J.; HASTINGS, T. G. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 5 Pt 1, p. 3318–3327, 1995.

RIBEIRO, F. F. et al. Purine nucleosides in neuroregeneration and neuroprotection. **Neuropharmacology**, 2015.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 140, n. 1-2, p. 1–47, 2003.

ROESLER, R. et al. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. **Neuroreport**, v. 11, p. 2537–2540, 2000.

ROOZENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stress, memory and the amygdala. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 423–433, 2009.

ROSA, J. M.; DAFRE, A. L.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like responses in the forced swimming test elicited by glutathione and redox modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 165–172, 2013.

ROSA, P. B. et al. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 1–6, 2014.

RUSH, A. J. et al. Comorbid psychiatric disorders in depressed outpatients: Demographic and clinical features. **Journal of Affective Disorders**, v. 87, p. 43–55, 2005.

RUSH, A. J. et al. Bupropion-SR, sertraline, or venlafaxine-XR after failure of SSRIs for depression. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 12, p. 1231–1242, 2006.

RYBKA, J. et al. Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 63, p. 187–94, 2013.

SAALTINK, D.-J.; VREUGDENHIL, E. Stress, glucocorticoid receptors, and adult neurogenesis: a balance between excitation and inhibition? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 13, p. 2499–515, 2014.

- SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1110–1115, 2007.
- SALOMON, R. M. et al. Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects. **Biological Psychiatry**, v. 54, p. 96–104, 2003.
- SANTARELLI, L. et al. Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 2003.
- SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, n. 10, p. 925–935, 2000.
- SAPOLSKY, R. M. Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 22, p. 12320–2, 23 out. 2001.
- SARANDOL, A. et al. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. **Human Psychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 67–73, 2007.
- SATOH, E.; SHIMEKI, S. Acute restraint stress enhances calcium mobilization and glutamate exocytosis in cerebrocortical synaptosomes from mice. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 5, p. 693–701, 2010.
- SCAPAGNINI, G. et al. Antioxidants as antidepressants: Fact or fiction? **CNS Drugs**, v. 26, n. 6, p. 477–490, 2012.
- SCHLOESSER, R. J.; MARTINOWICH, K.; MANJI, H. K. Mood-stabilizing drugs: Mechanisms of action. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 1, p. 36–46, 2012.
- SCHMIDT, A. P. et al. Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 6, p. 1247–63, 2010a.
- SCHMIDT, A. P. et al. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. **Brain Research**, v. 864, p. 40–43, 2000.

SCHMIDT, A. P. et al. Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. **Brain Research**, v. 1234, p. 50–8, 2008.

SCHMIDT, A. P. et al. Spinal mechanisms of antinociceptive action caused by guanosine in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 613, n. 1-3, p. 46–53, 2009a.

SCHMIDT, A. P. et al. The NMDA antagonist MK-801 induces hyperalgesia and increases CSF excitatory amino acids in rats: reversal by guanosine. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 91, n. 4, p. 549–53, 2009b.

SCHMIDT, A. P. et al. Guanosine Prevents Thermal Hyperalgesia in a Rat Model of Peripheral Mononeuropathy. **Journal of Pain**, v. 11, n. 2, p. 131–141, 2010b.

SCHMIDT, A. P.; LARA, D. R.; SOUZA, D. O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian central nervous system. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 116, n. 3, p. 401–416, 2007.

SCHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 12–21, 2012.

SCHOSSER, A. et al. European Group for the Study of Resistant Depression (GSRD)--where have we gone so far: review of clinical and genetic findings. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 7, p. 453–468, 2012.

SCHREIBELT, G. et al. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. **Brain Research Reviews**, v. 56, p. 322–330, 2007.

SCHUURMAN, A. G. et al. Increased risk of Parkinson's disease after depression: a retrospective cohort study. **Neurology**, v. 58, p. 1501–1504, 2002.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. A. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 341–346, 2000.

SEIFERT, G.; SCHILLING, K.; STEINHÄUSER, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 7, p. 194–206, 2006.

SELIGMAN, M.; BEAGLEY, G. Learned helplessness in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 88, n. 2, p. 534–541, 1975.

SELIGMAN, M. E.; ROSELLINI, R.; KOZAK, M. J. Learned helplessness in the rat: time course, immunization, and reversibility. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 88, n. 2, p. 542–7, 1975.

SEMINOWICZ, D. A. et al. Limbic-frontal circuitry in major depression: A path modeling metanalysis. **NeuroImage**, v. 22, p. 409–418, 2004.

SEN, S.; DUMAN, R.; SANACORA, G. Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Antidepressant Medications: Meta-Analyses and Implications. **Biological Psychiatry**, v. 64, p. 527–532, 2008.

SEO, J.-S. et al. NADPH oxidase mediates depressive behavior induced by chronic stress in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 28, p. 9690–9, 2012.

SHANSKY, R. M.; MORRISON, J. H. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: effects of circuit, hormones and rest. **Brain Research**, v. 1293, p. 108–13, 2009.

SHAO, L. et al. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. **Annals of Medicine**, v. 40, n. 4, p. 281–295, 2008.

SHELDON, A. L.; ROBINSON, M. B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochemistry International**, v. 51, p. 333–355, 2007.

SHELINE, Y. I. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 791–800, 2000.

SHELIN, Y. I. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 338–352, 2003.

SHEN, J. et al. Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 8235–8240, 1999.

SIBSON, N. R. et al. Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. **Neurobiology**, v. 95, p. 316–321, 1998.

SNYDER, J. S. et al. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 46, p. 14484–14495, 2009.

SNYDER, J. S. et al. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 458–61, 2011.

SOARES, F. A. et al. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. **Brain Research**, v. 1005, n. 1-2, p. 182–6, 2004.

SONG, H.; STEVENS, C. F.; GAGE, F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 39–44, 2002.

SORIANO, F. X.; HARDINGHAM, G. E. Compartmentalized NMDA receptor signalling to survival and death. **J Physiol**, v. 584, p. 381–387, 2007.

SOTRES-BAYON, F.; QUIRK, G. J. Prefrontal control of fear: more than just extinction. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 231–5, 2010.

SPALDING, K. L. et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1219–27, 2013.

SPITZER, N. C. Electrical activity in early neuronal development. **Nature**, v. 444, p. 707–712, 2006.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological Review**, v. 99, n. 2, p. 195–231, 1992.

SRINIVASAN, V. et al. Role of melatonin in mood disorders and the antidepressant effects of agomelatine. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 10, p. 1503–22, 2012.

STERU, L. et al. The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

SU, C. et al. Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 3, p. 617–625, 2009.

SU, C. et al. Guanosine promotes proliferation of neural stem cells through cAMP-CREB pathway. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 27, n. 3, p. 673–680, 2013.

SUH, H.; DENG, W.; GAGE, F. H. Signaling in adult neurogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 25, p. 253–75, 2009.

SURGET, A. et al. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 12, p. 1177–88, 2011.

SZUSTER-CIESIELSKA, A. et al. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 686–694, 2008.

TAKAMORI, S. VGLUTs: “exciting” times for glutamatergic research? **Neuroscience Research**, v. 55, n. 4, p. 343–351, 2006.

TANG, S. W.; HELMESTE, D.; LEONARD, B. Is neurogenesis relevant in depression and in the mechanism of antidepressant drug action? A critical review. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 13, n. 6, p. 402–412, 2012.

TAROZZI, A. et al. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 24, n. 3, p. 297–306, 2010.

TASKER, J. G.; DI, S.; MALCHER-LOPES, R. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5549–56, 2006.

TAVARES, R. G. et al. In vivo quinolinic acid increases synaptosomal glutamate release in rats: reversal by guanosine. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 4, p. 439–44, 2005.

THASE, M. E. Effectiveness of antidepressants: comparative remission rates. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 64 Suppl 2, p. 3–7, 2003.

THAUERER, B.; ZUR NEDDEN, S.; BAIER-BITTERLICH, G. Purine nucleosides: endogenous neuroprotectants in hypoxic brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 121, n. 3, p. 329–42, 2012.

TILLEUX, S.; HERMANS, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 10, p. 2059–70, 2007.

TONI, N. et al. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 727–734, 2007.

TORRES, F. V. et al. Electrophysiological effects of guanosine and MK-801 in a quinolinic acid-induced seizure model. **Experimental Neurology**, v. 221, p. 296–306, 2010.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, p. 145–155, 2003.

TRAVERSA, U. et al. Specific [(3)H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 4, p. 969–76, 2002.

TRAVERSA, U. et al. Rat brain guanosine binding site. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 5417–5425, 2003.

TRIVEDI, M. H. et al. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 12, p. 1243–1252, 2006.

TROTTI, D.; DANBOLT, N. C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 8, p. 328–34, 1998.

TSUBOI, H. et al. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **Journal of Affective Disorders**, v. 91, n. 1, p. 63–70, 2006.

TURKSEVEN, S. et al. Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 2, p. 701–707, 2005.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, p. 335–344, 2003.

UEMURA, Y. et al. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 22, n. 12, p. 1548–1553, 1991.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN PRAAG, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, p. 1030–1034, 2002.

VENERO, C.; BORRELL, J. Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: A microdialysis study in freely moving rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 2465–2473, 1999.

VILLANUEVA, R. Neurobiology of major depressive disorder. **Neural Plasticity**, v. 2013, p. 873278, 2013.

VINADE, E. R. et al. Effects of chronic administered guanosine on behavioral parameters and brain glutamate uptake in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 1-2, p. 248–253, 2005.

VINADE, E. R. et al. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. **Brain Research**, v. 977, p. 97–102, 2003.

VINADE, E. R. et al. Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 81, n. 2, p. 137–43, 2004.

VOGEL, T. et al. Transforming growth factor β promotes neuronal cell fate of mouse cortical and hippocampal progenitors in vitro and in vivo: Identification of *nedd9* as an essential signaling component. **Cerebral Cortex**, v. 20, n. 3, p. 661–671, 2010.

VOLPINI, R. et al. Evidence for the existence of a specific G protein-coupled receptor activated by guanosine. **ChemMedChem**, v. 6, n. 6, p. 1074–80, 2011.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 345, n. 1, p. 1–19, 2011.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743–800, 2015.

WARNER-SCHMIDT, J. L.; DUMAN, R. S. Hippocampal neurogenesis: Opposing effects of stress and antidepressant treatment. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 239–249, 2006.

WARNER-SCHMIDT, J. L.; DUMAN, R. S. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 11, p. 4647–4652, 2007.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

WILLNER, P. et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319–29, 1997.

WOOLLEY, C. S.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. **Brain Research**, v. 531, n. 1-2, p. 225–231, 1990.

YAN, H.-C. et al. Behavioral animal models of depression. **Neuroscience Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 327–337, 2010.

YANG, C.-H.; HUANG, C.-C.; HSU, K.-S. Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 17, p. 4288–4293, 2005.

YANIK, M.; EREL, O.; KATI, M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 16, p. 200–203, 2004.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, 2008.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research**, v. 711, n. 1-2, p. 163–174, 1996.

YOU, J. M. et al. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 6, p. 440–7, 2009.

YOUNG, E. A et al. Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 693–699, 1991.

ZAMOCKY, M. et al. Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes. **Arch Biochem Biophys**, v. 525, p. 131–144, 2012.

ZARATE JR., C. A. et al. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856–864, 2006.

ZARATE, C. et al. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? **Harvard Review of Psychiatry**, v. 18, n. 5, p. 293–303, 2010.

ZARATE, C. A. et al. An Open-Label Trial of Riluzole in Patients with Treatment-Resistant Major Depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, p. 171–174, 2004.

ZHAO, C. et al. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 3–11, 2006.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645–660, 2008.

ZHENG, K.; SCIMEMI, A.; RUSAKOV, D. A. Receptor actions of synaptically released glutamate: the role of transporters on the scale from nanometers to microns. **Biophysical Journal**, v. 95, n. 10, p. 4584–96, 2008.

ZHOU, W. et al. Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. **European Psychiatry**, v. 29, p. 1–5, 2013.

ZINK, M. et al. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 2, p. 465–473, 2010.