

Ana Belén Ramos Hryb

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO
TIPO-ANTIDEPRESSIVO E NEUROPROTETOR DO ÁCIDO
URSÓLICO**

Tese de Doutorado apresentada à
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutora em
Neurociências.

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

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Manuella Pinto Kaster

Florianópolis

2017

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

Ramos Hryb, Ana Belén

Estudo dos mecanismos envolvidos no efeito tipo antidepressivo e neuroprotetor do ácido ursólico / Ana Belén Ramos Hryb ; orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues , coorientadora, Manuella Pinto Kaster , 2017.

225 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2017.

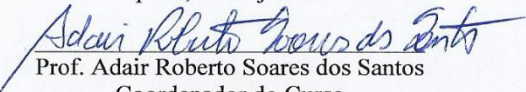
Inclui referências.

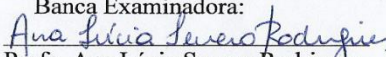
1. Neurociências. 2. ácido ursólico. 3. antidepressivo. 4. vias de sinalização celular. 5. neuroproteção. I. , Ana Lúcia Severo Rodrigues. II. , Manuella Pinto Kaster. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

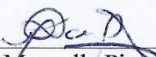
ANA BELEN RAMOS HRYB
**“ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO
EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E
NEUROPROTETOR DO ÁCIDO URSÓLICO”**

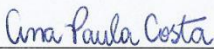
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

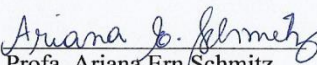
Florianópolis, 30 de junho de 2017.

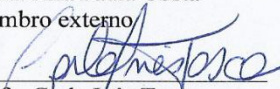

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

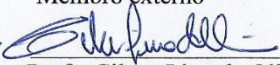
Banca Examinadora:

Prof. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Orientadora – UFSC

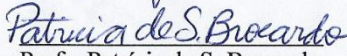

Prof. Manuella Pinto Kaster
Co-orientadora

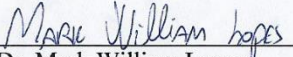

Prof. Ana Paula Costa
Membro externo


Prof. Ariana Ern Schmitz
Membro externo


Prof. Carla Inês Tasca
Membro - UFSC


Prof. Cilene Lino de Oliveira
Membro – UFSC


Prof. Patrícia de S. Brocardo
Membro – UFSC


Dr. Mark William Lopes
Membro (suplente)

Dedico esta dissertação

A mis Padres, mis guías espirituales y ejemplos de fortaleza y
perseverancia...

AGRADECIMENTOS

Se bem não é fácil escrever esta seção, se há algo que aprendi nesta caminhada da carreira cientista é que nada, absolutamente nada, do que está escrito neste texto é produto do trabalho de uma única pessoa. Pelo contrário, foram tantas as pessoas (alunos/as, professores/as, auxiliares, atendentes, colaboradores, colegas, profissionais, e assim por diante) que permitiram que este trabalho possa ser iniciado, conduzido, finalizado (e talvez continuado), que teria que escrever mais 225 páginas para que nenhuma delas fique fora deste capítulo especial do trabalho...

Começando pela ajuda das agências de fomento, da FAPESC (CAPES/MEC) principalmente por financiar a minha bolsa. Continuando pelo trabalho e a ajuda financeira da instituição pública da UFSC, dos funcionários do RU e da BU. Um agradecimento especial deve chegar ainda para o pessoal que cuida do Biotério e dos nossos animais. Outro espaço especial deve chegar até o pessoal do LAMEB, quem graças a sua paciência e o seu tempo permitiram que coletemos a grande maioria dos nossos resultados, além de permitir que aprendamos muitas técnicas.

À minha orientadora, Ana Lúcia, quem permitiu que entre no grupo do LANED, e conheça as neurociências. Este trabalho também é reflexo da sua dedicação, do seu tempo (muitas vezes as noites dos sábados), dos seus ensinamentos sem descanso, da sua paciência quando eu perdia a minha (muito seguido). Agradeço infinitamente a sua confiança nas minhas capacidades e de se preocupar do meu bem-estar. Você sempre foi como uma mãe para mim e para seus alunos. Um agradecimento especial também é para minha co-orientadora, a Manuella, quem também depositou uma grande confiança em mim. A sua dedicação, a possibilidade de desenvolver meu trabalho, de participar e discutir de

outros projetos, foram muito úteis no meu desenvolvimento profissional. Obrigada Manu por ter aceitado o convite para ser parte deste trabalho, a sua contribuição foi também essencial para seu desenvolvimento. Profes Ana e Manu, obrigada por terem incentivado também a desenvolver as minhas próprias ideias, por depositarem confiança nas minhas capacidades e pela paciência infinita em cada etapa do meu doutorado.

Aos colegas que trabalharam direto neste trabalho: Nicolle, Mauricio, Francis, o “Colla”, Julia, Vicente, Aline, Ana Paula, Andiará e Isabella, parceiros dos experimentos deste trabalho. A Mauricio, quem foi partícipe dos primeiros passos do projeto de doutorado. Obrigada por ter tido a paciência em explicar as coisas mais óbvias (ou nem tanto para mim), por ter discutido por horas sobre ciência, pelo apoio e incentivo para sair a conhecer o mundo e aplicar uma bolsa na IBRO. Ao Colla, quem me explicou mil vezes como diluir o ácido úrsólico e a corticosterona. Obrigada Colla pela parceria com o ácido úrsólico e pelas conversas sobre modelos de estresse, e as tuas dicas com a análise comportamental e o teu rigor nos experimentos. A Nicolle que sempre esteve disposta em ajudar, que esteve do meu lado contando células um domingo às 17 hs (perdão!!!), quem discutiu por horas os resultados de MTT que não davam certo. Me sinto privilegiada por ter acompanhado o teu trabalho desde o começo, por ter assistido o teu progresso como cientista e por ter depositado uma semente da cultura celular no teu caminho. Sem você as HT22 não teriam foto fofinha, e quem sabe muitas delas continuariam congeladas, Obrigada Aline e Ana Paula pelas parcerias, ensinamentos e o tempo disponibilizado. Obrigada pela dedicação com este trabalho, vocês foram partícipes de uma grande parte deles. Não posso esquecer também da Andi, pela ajuda e a disposição em

montar o trabalho com as HT22. Obrigada Isa e Andi pela imensa quantidade de blottings que fizeram para este trabalho, saibam que o seu esforço será recompensado.

Ao Francis, o menino querido do lab, quem faz o café mais gostoso (mas o do Mauro também é bom) e me pediu explicitamente estar num único parágrafo para ele. Saiba Francis L. “Pânzini” que você permitiu que eu mantenha a calma e a paciência. Saiba que, em parte, graças ao teu incentivo, não abandonei a ciência nem voltei para Argentina. Aliás, ainda continuo no Brasil! Eu acho que depois de conviver com argentinos, você já até manja do espanhol, ne? Peço unicamente que você deixe de imitar a “Pablo Escobar”, por favor! Obrigada por ter aceitado empreender a parceria nos experimentos e artigos. Obrigada Francis pela parceria nos inumeráveis cursos que oferecemos juntos. Aprendi muito com o teu “jeito” de dar aulas e fazer desenhos no quadro. Obrigada por ter dedicado o teu tempo em planejar a metodologia da atividade da caspase quase perto da data de Natal (podíamos fazer agora, ne?). Agradeço ter me ensinado a fazer desenhos bonitinhos. Obrigada pelos desenhos no artigo e pelas boas “ondas” na submissão de artigos. Apesar do *bullying* das sextas-feiras e dos almoços muitas vezes em silêncio, saiba que você fez que meus dias sejam mais leves no LANED®. De você levarei muitos ensinamentos, mas se há algo que não vou esquecer é do “Ana, chega de trabalhar e escrever, a Tese já ta pronta”.

Aos meus colegas do laboratório, a Luana, Priscilla, Morgana, Ágatha (h no meio?), Camille (agora a menina do LAMEB), a Dai, a Dai pequena, Luis, Gislaine, parceiros no dia a dia, nos almoços e nas jantas do RU, nas corridas, nos atrasos e nos problemas de cada dia. Luana

obrigada por compartilhar comida saudável conosco e se preocupar pela nossa saúde. Obrigada Fernanda, pela “calidez” (não sei a tradução para o português) da tua pessoa, pela humildade, pela paciência e a doçura, pela disposição em ajudar sempre que for necessário. Mesmo sem ter trabalhado diretamente contigo, sempre as tuas palavras foram essenciais quando tudo parecia um tormento. Obrigada Vivian, por ter me permitido conhecer o *Toffinho*, e ter achado um lar para ele. Valoro muito a tua doçura de pessoa. Obrigada por insistir na limpeza e em deixar o lab mais fofo, isso foi necessário para que o meu trabalho fosse mais organizado. Obrigada Mauren e Karen, as ICs que mesmo sem ter tempo correram atrás do PHmetro e da água destilada o MiliQ. Obrigada por autoclavar o material, por ter prestado atenção e ajudar sempre que for necessário. Obrigada Karen pela tua disposição, pelo tempo dedicado em analisar os vídeos do Ethowatcher. Obrigada meninas por serem sempre simpáticas. Dá muita vontade de chegar no lab e ouvir as vozes alegres de vocês.

A Ruth e o Michael, um casal que esteve sempre disposto para ajudar, mesmo que seja um domingo às 6 h a.m.!! Sério, vocês trabalharam tanto que as vezes dava vergonha de chegar no lab. Obrigada pela parceria, as praias, as discussões filosóficas da vida, a parceria no RU, obrigada pelas tardes de música, violão e flauta, pelos empréstimos e as devoluções. Chegar um final de semana ou um feriado e achar vocês trabalhando alegres, cantando e dispostos deu muita energia e entusiasmo em mim todos estes anos. Não posso esquecer dos colegas da Pós, principalmente daqueles que prestaram seu tempo e estiveram sempre para ouvir, ensinar e aconselhar nas etapas difíceis. Obrigada Gianni pela parceria nos SIC, nos seminários e as correções desta Tese. Obrigada

Adriano pelas conversas e pelas perguntas pertinentes. Obrigada Victor pelo entusiasmo em conhecer todo mundo por perto e os almoços de sábados.

Sou eternamente agradecida por ter tido a disciplina de Neurofisiologia no meu doutorado. Sinto pena de não ter conhecido o Prof. Marino antes, mas os sábios dizem que conhecemos as pessoas certas no momento certo, quando estamos dispostos a reconhecê-las e aprender delas. As aulas magistrais de você inspiraram muitas ideias e *insights*. Sempre vou levar comigo a explicação da “geladeira”. Graças a você, o Mauro também conheceu as Neurociências e graças a isso tive um parceiro e colega essencial no meu doutorado. Imagine quão divertido foi discutir o meu trabalho com o meu marido e colega da área. Obrigada por permitir que invada um pequeno espaço do seu lab para acompanhar os experimentos em pombos e as vezes ficar escrevendo e estudando no meu projeto. Obrigada por deixar que conheça os seus alunos e faça parte dos encontros. A loucura e sinceridade da Patrícia, a doçura da Laura, a genialidade do João, do Martin, o gigante cérebro do Fernando, formam uma parte de quem sou hoje. Aliás, muitas das discussões, ideias, sugestões, aprendizados neste convívio estão misturados nesta Tese. E é que, graças a este grupo de “gigantes”, também conheci a Profa. Cilene e seus alunos. Obrigada Patrick e Karol. Profa. Cilene, agradeço muito ter aberto as suas portas do lab, ter doado seu tempo e esforço, por entregar a sua confiança (diria até cega em inocentes como nós) em fazer o Curso da IBRO em Posadas. Jamais imaginei que conseguiríamos semelhante trabalho, mas nunca poderia ter acontecido sem o “aceito a proposta, vamos para frente” de você. Assim como este doutorado, o curso da IBRO foi como uma bisagra na minha formação pessoal e profissional.

Em termos financeiros não posso esquecer também do apoio recebido da UAM-Banco Santander e da IBRO, o qual permitiu expandir os nossos horizontes, coletar informação em outros institutos, me ensino a desenvolver maior confiança no trabalho do dia a dia, estabelecer novos contatos, a desenvolver idiomas e a melhorar a qualidade do nosso trabalho. Agradeço muito a oportunidade que nos deu a Profa. Manuela García López e a Maria Cano (da Universidad Autónoma de Madrid). Muchísimas gracias Profesoras por el espacio otorgado, la hospitalidad, la confianza y el tiempo dedicado a este trabajo y en mi formación personal. Muchísimas gracias también al equipo del Instituto Fundación Teófilo Hernando, a su director, el Profesor Antonio García. Muchas gracias a todos los colegas del IFTH que colaboraron directamente con este trabajo, a Isaskun (gracias por ayudarme con el ensayo de citometria), Ana Ruiz, Cristina, Javier, Fernanda, Quique, Víctor, Patricia, Vanessa (por tu tiempo con los animales), Alejandro y Javier por ayudarme y permitirles ayudarles con el trabajo de cultivo celular. Muchas gracias a Esther y Cristina por la ayuda con las HT22. Una mención especial también para Marcos, que diseñó parte de los compuestos en 3D del capítulo sobre terpenoides y polifenoles, y me enseñó a utilizar el ChemDraw. Muchísimas gracias a toda la gente de la Unidad de Citometria y del Hospital de la Princesa. Allí conocí a mucha gente que inspiró discusiones para esta tesis. Muchas gracias especiales a Carmen Ovejero por tus enseñanzas y consejos para la vida profesional. Carolina Castillo, muchísimas gracias por tu compañerismo, tu apoyo, solidaridad y ayuda durante mi estadía en Madrid. Miles de gracias por las sonrisas, las comidas, los abrazos y la compañía cuando las “vacas estaban flacas”. Gracias por la confianza y el cariño depositados.

Aos Professores e alunos de laboratórios anexos e parceiros. Ao Professor Rui Prediger, pela ajuda e confiança depositada no trabalho do capítulo I. Ao Professor Rodrigo por ceder seu tempo e espaço em desenvolver parte do trabalho do capítulo III. Ao Prof. Alcir Dafre pela ajuda e por disponibilizar as células HT22 para o desenvolvimento do capítulo III. Aos Professores do Departamento e ao secretário da PPGNeuro, Nivaldo, pelo tempo e o trabalho dedicados.

A meus amigos e colegas que ajudaram a que não desista e não perca de vista o objetivo. A Ingrid por ter me ajudado sempre e colaborado na cultura, na organização e ideação do Curso da IBRO. Ingrid você foi uma parte muito importante no desenvolvimento desta Tese. A Lucia pelo apoio brindado em todo momento. A Adriana por la ayuda incesante y las charlas de “cualquier cosa”. A Vivi Polli. O Yago que adorava o Toffinho. A Caro Thompsom, A Caro Castillo (again).

À o meu namorado, marido, esposo, parceiro, colega, minha laranja completa, meu amigo. Sou uma mulher muito feliz do mundo por ter achado alguém com quem compartilhar tudo, até as neurociências. Somos um casal que colabora em tudo, somos amigos e confidentes. Sei que não teria nem começado o doutorado e que muitas coisas as aprendi contigo neste caminho. Adoro que cada um tenha adoptado um espaço pessoal, que cada um siga seus sonhos, que você goste da etologia e eu da bioquímica/genética. Obrigada por tudo! À minha família, Yoli, Pancho, Eddy, Lore, Lisa, Amalia, meus sobrinhos. Obrigada pelo apoio e a ajuda sempre, desde que comecei tudo isto, foi de grande valia ter vocês no meu caminho.

A mi Papá, un sabio que sabe tanto que ni necesita hablar conmigo para saber qué me ocurre. Quién a más de 1000 km era capaz de calmar

cualquier tormenta. Soy agradecida por haber tenido un padre tan paciente, perseverante y luchador contra las mareas más terribles. Desde el cielo Mamá nos ayudó y sé que está orgullosa de lo que conseguimos. No puedo quejarme de absolutamente nada porque jamás me faltó algo gracias a ustedes.

Finalmente aos camundongos, que deram a vida neste trabalho. Sem estes animais nada poderia ter sido planejado nem realizado. Talvez algum dia comecem a exigir a autoria nos nossos artigos, será um dia bastante interessante de vivenciar....

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.
(George Bernard Shaw)*

RESUMO

Uma série de estudos têm sugerido que o ácido ursólico (AU) possui um potencial como antidepressivo, sendo que este composto triterpenóide (isolado de plantas como *Rosmarinus officinalis L.*) reduz a imobilidade de camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC). Este efeito tipo-antidepressivo depende, em parte da atividade monoaminérgica. Além disso, já foi indicado que o AU apresenta efeitos neuroprotetores e anti-estresse em modelos *in vivo* e *in vitro*. O presente trabalho verificou: a) participação de proteínas cinase e, b) o envolvimento da ativação da enzima antioxidante heme oxigenase 1 (HO-1) no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC em camundongos. Adicionalmente, utilizamos um modelo *in vitro* que mimetiza os efeitos neurotóxicos da produção exacerbada de glicocorticóides que ocorre frente a eventos crônicos de estresse e que, em consequência, induzem a morte neuronal hipocampal e podem estar relacionados com o desenvolvimento do transtorno depressivo maior. Com este modelo *in vitro* investigamos: c) a capacidade do AU em proteger as células HT22 dos efeitos citotóxicos da corticosterona assim como a participação de proteínas cinase e de HO-1 neste efeito. O efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC foi abolido pelos inibidores: H-89 (inibidor de proteína cinase A, PKA), KN-62 (inibidor de proteína cinase II dependente de Ca^{+2} /calmodulina, CaMKII), queleritrina (inibidor da proteína cinase C, PKC), U0126 (inibidor da cinase regulada por sinal extracelular 1/2, inibidor de MEK1/2) PD09058 (inibidor de MEK1/2,) e a protoporfirina de zinco (inibidor de HO-1) mas não pela wortmanina ou LY294002 (inibidores de fosfatidilinositol-3-cinase ou PI3K). A combinação de doses sub-efetivas de AU com a protoporfirina de cobalto (ativador de

HO-1) induziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC em camundongos. O tratamento dos animais com AU (assim como com PPCo) induziu um aumento dos níveis de HO-1 no hipocampo dos camundongos. Os ensaios *in vitro* demonstraram que a incubação durante 48 h, mas não 24 h com 5 ou 15 μM de AU e a co-incubação durante 24 h com 50 μM de corticosterona protegeu as células HT22 da redução da viabilidade, da morte celular, do apoptose e do aumento da formação de vesículas ácidas sugestivas de autofagia induzidos pela corticosterona. Além disso, a incubação das células HT22 com AU foi capaz de reverter a redução dos níveis de fosforilação de ERK1/2, mas não de JNK induzidos pela corticosterona. O efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona foi abolido por H-89, KN-62 e queleritrina, mas não pelo LY294002. Nenhuma das condições experimentais *in vitro* alteraram o imunoconteúdo de HO-1. Como conclusão, os dados presentes neste trabalho sugerem que o efeito anti-imobilidade no TSC em camundongos e protetor do AU frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22 depende, pelo menos em parte, da ativação de PKA, PKC, MEK/ERK1/2 e CaMKII, mas não de PI3K. Além disso, de forma diferente ao efeito citoprotetor *in vitro*, o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC em camundongos depende também em parte da ativação de HO-1. Este conjunto de dados indica que o AU possui um potencial como antidepressivo e neuroprotetor principalmente graças a sua capacidade de modular vias de sinalização envolvidas na sobrevivência, proliferação e mecanismos antioxidantes.

Palavras-chave: ácido ursólico, neuroprotetor, antidepressivo, corticosterona, proteínas cinase, HO-1.

ABSTRACT

Several studies have suggested that ursolic acid (UA) may have a potential as antidepressant, since this triterpenoid compound (isolated from plants such as *Rosmarinus officinalis L.*) induced the reduction of the immobility time of mice submitted to the tail suspension test (TSC). This antidepressant-like effect may depend, at least in part, on monoaminergic system. In addition, several studies reported that UA presented neuroprotective and anti-stress effects in *in vivo* and *in vitro* models. The present study evaluated: a) the involvement of protein kinases and, b) the participation of heme oxygenase 1 (HO-1) in the antidepressive-like effect of UA in the TSC in mice. Additionally, we performed an *in vitro* model that mimics the neurotoxic effect of an exacerbated production of glucocorticoids that occurs as a result of chronic stressful events, which in consequence may induce hippocampal neuronal loss that may be related to the development of major depressive disorder. Using this experimental model, we investigated c) the neuroprotective effect of UA against the cytotoxicity induced by corticosterone in HT22 cells as well as the participation of protein kinases and HO-1 in this effect. The antidepressant-like effect of UA was abrogated in the TSC by H-89 (inhibitor of protein kinase A or PKA), KN-62 (inhibitor of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II or CaMKII), chelerythrine (inhibitor of protein kinase C or PKC), U0126 or PD09058 (inhibitors of mitogen-activated protein kinase 1/2 or MEK1/2) and zinc protoporphyrin IX (inhibitor of HO-1) but not by wortmannin or LY294002 (inhibitors of phosphoinositide 3-kinase, PI3K). The combination of sub-effective doses of cobalt protoporphyrin IX (inductor of HO-1) and UA induced an antidepressive-like effect in the TSC in

mice. The treatment of animals with UA or PPCo induced an increased level of HO-1 in the hippocampus of mice. On the other hand, the *in vitro* experiments showed that the incubation for 48 but not 24 h with 5 or 15 μ M UA before the co-incubation with 50 μ M corticosterone protected the HT22 cells from the cytotoxicity, apoptosis and formation of acidic vesicular organelles indicative for autophagy induced by corticosterona. In these experiments, the treatment of HT22 cells with UA also prevented the reduction of phosphorylated ERK1/2 but not JNK levels induced by corticosterone treatment. This cytoprotective effect of UA against corticosterone cytotoxicity was abolished by H-89, KN-62 and quelerythrine, but not by LY294002. None of the *in vitro* experimental conditions induced an alteration in the immunocontent of HO-1. As a conclusion, the data presented here indicated that the antiimmobility effect in the TSC in mice and the protective effect of UA against the cytotoxicity induced by corticosterone in HT22 cells may involve the activation of PKA, PKC, MEK/ERK1/2 and CaMKII but not PI3K activity. In contrast to the *in vitro* neuroprotective effect of UA, the antidepressive-like effect in the TSC in mice may depend, at least in part, on HO-1 activity. Finally, we can conclude that UA is a compound with neuroprotective and antidepressant potential for stress-related disorders mainly by its capacity to modulate intracellular signaling pathways involved in proliferation, survival and antioxidant mechanisms.

Keywords: ursolic acid, neuroprotective, antidepressant, corticosterone, protein kinase, HO-1.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1: Estrutura dimensional do AU	35
Figura 1.2: Esquema simplificado da biossíntese do ácido ursólico	37
Figura 1.3: Mecanismos de neuroproteção <i>in vitro</i> mediados pelo AU	47
Figura 1.4: Alvos moleculares do AU no SNC	55
Figura 1.5: Prevalência do Transtorno Depressivo Maior (TDM) ao longo da vida e critérios de diagnóstico segundo o DSM5	57
Figura 1.6: Cascatas de sinalização intracelular envolvidas no desenvolvimento do TDM e na resposta aos fármacos antidepressivos.	64
Figura 1.7: Mecanismo de ativação da cascata de sinalização dependente de Nrf2/HO-1.	66
Figura 1.8: Funcionamento e regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).	74
Figura 1.9: Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na neurotoxicidade induzida pela corticosterona.	78
Figura 1.10: Mecanismos anti e pró-apoptóticos induzidos pela corticosterona	80
Figura 1.11: Mecanismo celular de autofagia.	83

5. Capítulo I: VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR IMPLICADAS NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO AU EM CAMUNDONGOS

Figura 5.1: Protocolo experimental para a investigação do papel de proteínas cinase no efeito tipo-antidepressivo do AU no teste de suspensão pela cauda (TSC) em camundongos	97
Figura 5.2: TSC	99
Figura 5.3: Teste de campo aberto	100
Figura 5.4: Efeito do tratamento com inibidores de cinases no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.....	104
Figura 5.5: Efeito do tratamento com inibidores de PI3K no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.....	105
Figura 5.6: Efeito do tratamento com inibidores de cinases no comportamento locomotor de camundongos tratados com AU no TCA.	106

Figura 5.7: Efeito da administração de AU (0,1 mg/kg, p.o.) durante 60 min nos níveis de DARPP-32 Thr ⁷⁵ , t-DARPP-32 e nos níveis de fosforilação de DARPP-32 Thr ⁷⁵ no hipocampo de camundongos.....	108
Figura 5.8: Vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito tipo-antidepressivo do AU.....	117

6. Capítulo II: PAPEL DA HO-1 NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO AU

Figura 6.1: Inibição da HO-1 por PPZn no efeito tipo-antidepressivo do AU.....	124
Figura 6.2: Efeito tipo-antidepressivo sinérgico de um indutor de HO-1 (PPCo) em combinação com o AU no TSC.....	125
Figura 6.3: Efeito da administração de AU ou PPCo sobre o tempo de imobilidade e sobre o nível de HO-1 no hipocampo de camundongos.....	127
Figura 6.4: Papel da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.....	132

7. Capítulo III. INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR IN VITRO DO ÁCIDO URSÓLICO

Figura 7.1: Efeito citotóxico da corticosterona em células HT22 depende da ativação de GR.	143
Figura 7.2: Efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade da corticosterona em células HT22.....	145
Figura 7.3: Microfotografias da morfologia de células HT22	146
Figura 7.4: Análise da morte celular em células HT22 tratadas com corticosterona ou AU.	148
Figura 7.5: Análise do efeito citoprotetor do AU sobre a apoptose induzida pela corticosterona em células HT22	150
Figura 7.6: Análise da autofagia em células HT22 tratadas com corticosterona ou AU.	152
Figura 7.7: Efeito dos inibidores de proteínas cinase no efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona.	155
Figura 7.8: Efeito da exposição de células HT22 à corticosterona sobre os níveis de fosforilação de Erk1/2 e p38MAPK.	157
Figura 7.9: Avaliação dos níveis de fosforilação de Erk1/2 e JNK de células HT22 expostas a corticosterona ou AU.....	159

Figura 7.10: Análise dos níveis de HO-1 de células HT22 expostas a corticosterona ou AU.....	160
Figura 7.11: Mecanismo citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22.....	177

8. DISCUSSÃO GERAL

Figura 8.1: Resumo esquematizado dos principais achados do presente trabalho.....	185
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Plantas e ervas que contêm AU na sua composição.....	35
Tabela 2: Anticorpos utilizados nesta Tese.....	223

LISTA DE ABREVIATURAS

11 β -HSD1	11 β -hidróxiesteróide desidrogenase tipo 1
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT _{1A}	receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 1A
7-AAD	7-aminoactinomicina D
A β	proteína beta Amiloide
Ach	acetilcolina
AchE	acetilcolinesterase
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
AK	ácido kainico
Akt	proteína cinase B
AMPc	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
APP	proteína precursora amiloide
ARE	elemento responsivo a antioxidantes
Atg	genes ligados à autofagia
ATP	adenosina trifosfato
AU	ácido ursólico
AVO	organelas vesiculares ácidas
BACE1	beta-secretase 1
Bak	proteína 1 antagonista/exterminadora de Bcl-2
Bax	proteína X associada à Bcl-2
Bcl-2	proteína 2 de linfoma de células B
Bcl-xL	proteína 2 de linfoma de células B extralarga
BDNF	fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
CaMKII	proteína cinase II dependente de Ca ⁺² /calmodulina
COX-2	ciclooxigenase 2
CREB	elemento de resposta à ligação do AMPc
CR	cromatina
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
CRHR1	receptor 1 do hormônio liberador de corticotrofina
D ₁	receptor de dopamina tipo 1
D ₂	receptor de dopamina tipo 2
DA	doença de Alzheimer
DARPP-32	fosfoproteína neuronal dependente de AMPc e
dopamina	
DBH	dopamina beta-hidroxilase
DMEM	médio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido

DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densitometria ótica
DP	doença de Parkinson
DSM5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos
Mentais	
ECI	estresse crônico imprevisível
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	erro padrão da média
ERK	cinases reguladas por sinais extracelulares
ERO	espécie reativa de oxigênio
Fe ⁺²	ferro
GR	receptor de glicocorticoide
GRE	elemento responsivo a glicocorticóides
GABA	γ-ácido aminobutírico
HBSS	tampão solução balanceada salina de Hank
HEPES	ácido 2—etanossulfônico
HO	heme oxigenasse
HO-1	heme oxigenasse 1
HPA	eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
i.c.v.	intracerebroventricular
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
i.v.	intravascular
IL-6	interleucina 6
IP	iodeto de propídeo
JNK	proteína cinase c-Jun NH2
Keap1	proteína 1 associada à proteína epiclorigidrina tipo
Kelch	
MAO-A	monoamina oxidase A
MAO-B	monoamina oxidase B
MAPK	proteína cinase ativada por mitógenos
MEK/ERK	via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK
MMP	metaloproteínases de matriz
MP	potencial de membrana mitocondrial
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MR	receptor de mineralocorticoide
mTOR	proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-
tetrazolium	
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio

NE	noradrenalina
NFκβ	fator de transcrição nuclear kappa B
NMDAR	receptor de N-metil-D-aspartato
Nrf2	fator eritróide nuclear relacionado com o fator 2
Opioide R	receptor de opioide
p70S6α	proteína cinase ribossomal S6K1
PBS	tampão fosfato salina
p.o.	<i>per os</i>
PI3K	fosfatidilinositol-3-cinase
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
Proteína G	proteína de ligação ao nucleotídeo guanosina
PPARγ	receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
gama	
PSD95	proteína de densidade pós-sináptica 95
RE	retículo endoplásmico
RNA _m	RNA mensageiro
rpS6	proteína ribossomal S6
SFB	soro fetal bovino
SDS	dodecil sulfato de sódio
Ser	serina
SN	sistema nervoso
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TBS	Solução salina TRIS tamponada
TBS-T	Solução salina TRIS tamponada com 0,1% Tween-
20	
TCA	teste do campo aberto
TDM	Transtorno Depressivo Maior
Thr	treonina
TIMP1	inibidor tecidual de metaloproteinase 1
TLR	receptores do tipo Toll
TNF-α	fator de Necrose Tumoral alfa
TSC	teste de suspensão pela cauda
UANL	nanolipossoma de ácido ursólico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
>	maior
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
cm	centímetro
g	grama
h	horas
kDa	kilodalton
kg	quilograma
M	molar
mA	miliamper
m ²	metro quadrado
µM	micromol
min	minutos
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
nM	nanomol
nm	nanómetro
α	alfa
β	beta
κ	kapa
γ	gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	33
1.1 ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS	33
1.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO AU.....	34
1.2.1 Estudos clínicos com o AU	39
1.2.2 Estudos pré-clínicos dos efeitos do AU	41
1.3 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR (TDM).....	56
1.3.1 Mecanismos intracelulares responsáveis pelo desenvolvimento do TDM e na resposta aos antidepressivos..	57
1.3.2 O papel do hipocampo no TDM	69
1.3.3 O efeito do distresse no hipocampo e seu papel no desenvolvimento do TDM	71
1.3.4 Mecanismos celulares e moleculares do efeito neurotóxico de glicocorticóides no hipocampo	77
1.3.5 Mecanismos de morte celular envolvidos na neurotoxicidade dos glicocorticóides	78
1.3.6 Modelos in vivo para o estudo de efeitos e mecanismos de compostos com ação tipo-antidepressiva	85
1.3.7 Modelos in vitro de neurotoxicidade e investigação do mecanismo intracelular dos antidepressivos	85
2. JUSTIFICATIVA	89
3. HIPÓTESE	91
4. OBJETIVO GERAL	93
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	93
5. Capítulo I: VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR IMPLICADAS NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS	95
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	95

5.2 MATERIAL E MÉTODOS	95
5.2.1 Animais	95
5.2.2 Agentes farmacológicos	96
5.2.3 Desenho experimental	96
5.2.4 Injeções i.c.v.	97
5.2.5 Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)	98
5.2.6 Teste do Campo Aberto (TCA)	99
5.2.7 Análise do imunoconteúdo das proteínas por Western Blot	100
5.2.8 Análise estatística	102
5.3 RESULTADOS.....	102
5.4 DISCUSSÃO.....	108
6. Capítulo II: PAPEL DA HO-1 NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS	119
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	119
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	120
6.2.1 Animais	120
6.2.2 Agentes farmacológicos	120
6.2.3 Desenho experimental	121
6.2.4 Testes comportamentais	121
6.2.5 Análise do imunoconteúdo de proteínas por Western Blot	122
6.2.6 Análise estatística	123
6.3 RESULTADOS.....	123
6.4 DISCUSSÃO.....	127
7. Capítulo III. INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR IN VITRO DO ÁCIDO URSÓLICO	133
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	133

7.2 MATERIAL E MÉTODOS	134
7.2.1 Drogas	134
7.2.2 Cultura de células HT22	134
7.2.3 Ensaio de viabilidade celular	135
7.2.4 Dupla marcação fluorescente para Iodeto de propídeo (IP) e Hoechst 33342	135
7.2.5 Citometria de fluxo	136
7.2.6 Análise de autofagia	138
7.2.7 Western blotting	138
7.2.8 Protocolos experimentais	140
7.2.9 Análise estatística	141
7.3 RESULTADOS	141
7.4 DISCUSSÃO	161
8. DISCUSSÃO GERAL	179
9. CONCLUSÃO	187
10. PERSPECTIVAS	189
11. REFERÊNCIAS	191
12. APÊNDICE	223
13. ANEXO	225

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS

Compostos fitoquímicos possuem uma grande variedade de benefícios para a saúde humana e, isto deve-se principalmente ao conteúdo de nutracêuticos derivados de polifenóis ou terpenóides presentes nos diversos óleos essenciais, ervas, frutas, vegetais e temperos (DE LAS HERAS *et al.*, 2003; GRASSMANN, 2005; KESERVANI *et al.*, 2016). Em particular, os compostos terpenoides constituem um grupo bastante diverso de aproximadamente 20.000 metabólitos secundários (LIBY *et al.*, 2007). Estes compostos podem ser achados nos líquens, algas e musgos, mas também são produzidos e secretados pelas plantas tendo a função de se proteger das interações com insetos, patógenos e outras plantas. Os terpenoides são definidos principalmente pelo número de unidades de isopreno e grupos contendo oxigênio, como álcool, aldeído ou cetona e, incluem compostos como esteroides e saponinas (ZHONG e YUE, 2005; THOLL, 2015), como por exemplo: monoterpenoides (C10), diterpenoides (C20), triterpenóides (C30) e politerpenoides (C>40) (THOLL, 2015). Estes compostos são derivados do precursor isopentenil difosfato, o qual é sintetizado no citosol ou em plastídios (THOLL, 2015).

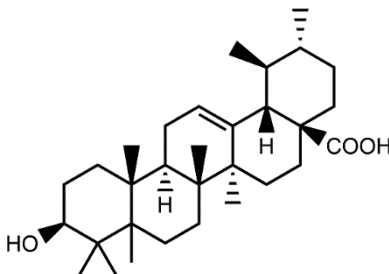
Um grande destaque, nos últimos anos, foi colocado no estudo das atividades biológicas dos triterpenóides devido aos seus efeitos antitumorais, antivirais, antimicrobianos e anti-inflamatórios (DE LAS HERAS *et al.*, 2003; THOLL, 2015). Além disso, devido à presença de grupos contendo hidroxila nas cadeias de carbono da sua estrutura, os triterpenóides possuem a capacidade de interagir e neutralizar radicais livres, uma característica importante para a atividade antioxidante destes

compostos (GRASSMANN, 2005; GONZALEZ-BURGOS e GOMEZ-SERRANILLOS, 2012). Entre eles, o ácido oleanóico, o ácido betulínico e o ácido ursólico (AU) são triterpenóides com efeitos biológicos diversos que incluem efeitos antifúngicos, antivirais e antitumorais (DZUBAK *et al.*, 2006; SHANMUGAM *et al.*, 2013). Devido a esta grande variedade de propriedades, o estudo de extratos e de compostos derivados de AU têm atraído a atenção também para o seu uso no tratamento de doenças neurodegenerativas e de transtornos psiquiátricos. De fato, algumas evidências sugerem que o AU teria um efeito dependente da transmissão monoaminérgica (ver Seção 1.2.2.1). Estas propriedades fazem do AU um composto com potencial terapêutico no tratamento de transtornos psiquiátricos e doenças neurodegenerativas.

1.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DO AU

Um enfoque bem importante nos últimos anos foi dedicado ao estudo dos efeitos biológicos do AU (Ácido Urs-12-en-3 β -ol-29-óico1 4, C₃₀H₄₈O₃, PubChem CID 64945, Fig. 1.1), um triterpenóide comumente encontrado nas plantas. O AU é bastante utilizado como composto farmacológico emulsionante e inativo, como cosmético e na indústria alimentícia (WOZNIAK *et al.*, 2015).

A estrutura básica do AU compreende C (carbono)-30 unidades de isoprenoides formando um triterpenóide pentacíclico, que resulta em um peso molecular de 456,70 g (Fig. 1.1).

Figura 1.1: Estrutura bidimensional do AU

A imagem foi produzida pelo autor com ChemDraw Professional 15.0

Este metabólito foi inicialmente encontrado na cera epicuticular da maçã na década de 20 (ULLEVIG *et al.*, 2011; SZAKIEL *et al.*, 2012). Estudos mais recentes têm demonstrado a presença do AU em diferentes plantas medicinais e de consumo na dieta como *Eriobotrya japonica* (nêspera), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Asctostaphylos uva-ursi* (uva ursina), *Ocimum sanctum* (manjerição santo), e também na casca da ameixa (Tabela 1) (JAGER *et al.*, 2009; SZAKIEL *et al.*, 2012).

Tabela 1: Plantas e ervas que contêm AU na sua composição

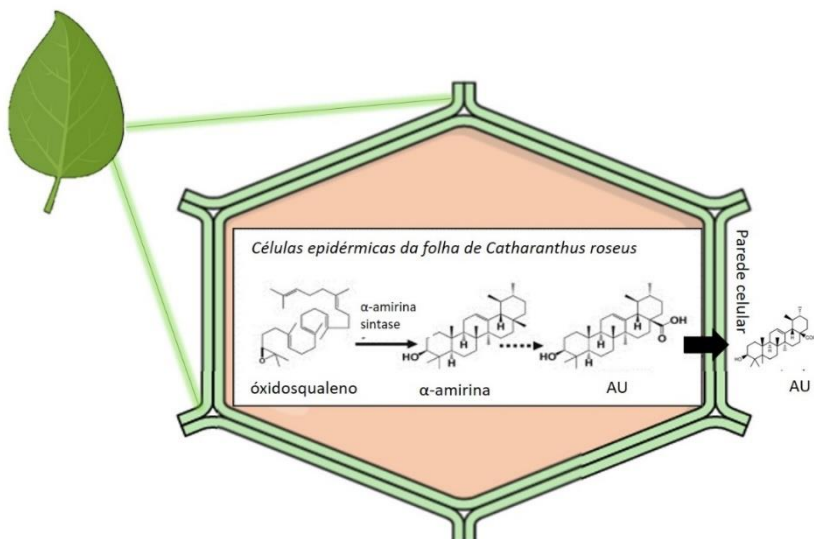
Nome botânico	Nome popular	Parte da planta	Referência
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	ciwuja	frutos	(LEE <i>et al.</i> , 2002) (GONZÁLEZ-TRUJANO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Agastache mexicana</i>	hissopo-mexicano	inflorescências	
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	uva ursina	partes aéreas	(VERANO <i>et al.</i> , 2013) (JAGER <i>et al.</i> , 2009; CALIGIANI <i>et al.</i> , 2013)
<i>Coffea arabica</i>	café	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Corni fructus</i>	fructus corni- dogwood	planta inteira	(HONG <i>et al.</i> , 2012)
<i>Crataegus monogyna</i>	espinheiro comum	flores	(CALIGIANI <i>et al.</i> , 2013)
<i>Cussonia bancoensis</i>	não especificado	folhas	(TAPONDJOU <i>et al.</i> , 2003)
<i>Eriobotrya japonica</i>	nêspera	folhas	(ROLLINGER <i>et al.</i> , 2010)
<i>Eucalyptus spp.</i>	eucaliptus	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Gardenia jasminoides</i>	jasmim de cabo	frutos	(KIM <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ilex paraguariensis</i>	erva mate	folhas	(PREDIGER <i>et al.</i> , 2008)

<i>Lagerstroemia speciosa</i>	resedá-gigante	folhas	(CALIGIANI <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lavandula augustifolia</i> Mill	lavanda	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009) (CHATTOPADHYAY <i>et al.</i> , 2003)
<i>Mallotus peltatus</i>	não especificado	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Malus domestica</i>	maçã	casca da fruta	
<i>Melissa officinalis</i>	erva cidreira verdadeira	folhas Partes aéreas sem as flores	(IBARRA <i>et al.</i> , 2010)
<i>Mentha piperita</i> L.	menta-hortelã	partes aéreas	(SHEN <i>et al.</i> , 2011) (VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2006)
<i>Miconia albicans</i>	canela de velho	partes aéreas	(TAVIANO <i>et al.</i> , 2007)
<i>Nepeta sibthorpii</i>	erva-dos-gatos	partes aéreas	(TAVIANO <i>et al.</i> , 2007)
<i>Nerium oleander</i>	loendro	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009) (JOTHIE RICHARD <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ocimum sanctum</i> L.	manjeriço santo	planta inteira	(CHUNG <i>et al.</i> , 2001; HEO <i>et al.</i> , 2002)
<i>Origanum majorana</i>	orégano	planta inteira	
<i>Origanum vulgare</i> L.	orégano	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Ortosiphon stamineus</i>	chá de java	partes aéreas	(CALIGIANI <i>et al.</i> , 2013)
<i>Plantago major</i>	sete nervos	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Propolis</i>	propolis	pólen	(CALIGIANI <i>et al.</i> , 2013)
<i>Prunus laurocerasus</i> L.	louro cerejo	folhas	(JETTER e SCHÄFFER, 2001)
<i>Punica granatum</i> L.	romã	casca de raiz	(CALIGIANI <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	alecrim	folhas	(MACHADO <i>et al.</i> , 2012; MACHADO <i>et al.</i> , 2013) (GONZÁLEZ-CORTAZAR <i>et al.</i> , 2013)
<i>Salvia elegans</i> Vahl	sálvia-ananás	folhas	
<i>Salvia officinalis</i> L.	sálvia	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Sambucus nigra</i> L.	sabugueiro	folhas	(JAGER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Silphium trifoliatum</i> and <i>S. integrifolium</i>	silfa da américa do norte	folhas	(KOWALSKI, 2007)
<i>Staphylea holocarpa</i>	bladdernut americano	folhas e galhos	(NOVOTNY <i>et al.</i> , 2003)
<i>Styrax benzoin</i>	benjoeiro	exudado	(CALIGIANI <i>et al.</i> , 2013) (ROWE e ORR, 1949; JAGER <i>et al.</i> , 2009)
<i>Thymus vulgaris</i> L.	tomilho	folhas	
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	uva do monte, arando	frutos e folhas	(SZAKIEL <i>et al.</i> , 2012) (CHANDRAMU <i>et al.</i> , 2003)
<i>Vitex negundo</i> L.	vitex	folhas	

Um dado importante a ser destacado reside no fato de que tanto o conteúdo quanto a composição em fitoquímicos difere entre as espécies de plantas, principalmente devido à presença e atividade de diferentes

enzimas responsáveis pela síntese do composto (Fig. 1.2) (JAGER *et al.*, 2009). A biossíntese do AU compreende um processo de diversos passos que envolve o dobramento e a ciclização do esqualeno, que leva à formação do anel damarenilo (YU *et al.*, 2013) (Fig. 1.2). Subsequentemente, este anel sofre uma expansão e extra-ciclização formando o quinto anel do AU (LEAL *et al.*, 2012; DAR *et al.*, 2016).

Figura 1.2: Esquema simplificado da biossíntese do AU



Nas folhas da planta *Catharanthus roseus*, a síntese do AU (ácido ursólico) começa com a ciclização do esqualeno e esta é mediada pela ação da enzima α -amirina sintase que converte a α -amirina em AU. Finalmente, este é secretado e concentrado na parede das células epidérmicas da folha, onde funciona como metabólito secundário e permite proteger as plantas de patógenos e agressores externos. Adaptado de (YU *et al.*, 2013). A figura foi produzida com permissão usando “Mind the Graph” (www.mindthegraph.com).

A solubilidade deste composto é bastante baixa em água, no entanto pode ser solubilizado em álcool, NaOH e em outras soluções polares. Esta solubilidade limitada em água pode chegar a comprometer a biodisponibilidade deste composto nos órgãos e tecidos (WOZNIAK *et*

al., 2015). De acordo com as características físico-químicas descritas anteriormente, estudos tanto pré-clínicos (LIAO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2011) quanto clínicos (XIA *et al.*, 2011) já têm demonstrado a baixa biodisponibilidade e solubilidade reduzida do AU em água. Contudo, deve ser notado que a biodisponibilidade deste composto também pode ser influenciada por diversos fatores como diferenças individuais, características da microbiota, enzimas digestivas e da matriz alimentar (SCHOLZ e WILLIAMSON, 2007; BOHN, 2014). Finalmente, deve-se destacar que este composto é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, chegando a ser detectado no cérebro uma hora após a sua administração (10 mg/kg, p.o.) em ratos (CHEN *et al.*, 2011), o que sugere que o AU possa exercer algum efeito no sistema nervoso central (SNC).

Um aspecto importante em relação à biossegurança do AU reside no fato de que já foi demonstrado que este pode inibir a ação das enzimas do citocromo P450 (KIM *et al.*, 2004), além de inibir a captação de fármacos como a rosuvastatina (HUA *et al.*, 2014) e poder inibir a ação da uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase 1A3 e 1A4, as quais metabolizam substratos como a clomipramina, amitriptilina, clozapina e hormônios esteroides (XIE *et al.*, 2016). Atualmente o AU é comercializado como um suplemento nutricional e é considerado seguro devido a sua baixa toxicidade, sendo que a administração de até 1000 mg/kg p.o. em camundongos não causou efeitos tóxicos nem letais nestes animais (GAO *et al.*, 2008).

1.2.1 Estudos clínicos com o AU

Considerando que o AU pode ser comercializado sem restrição na população (LEUNG e FOSTER, 1996), torna-se importante investigar aspectos da farmacocinética, farmacodinâmica e efeitos secundários do AU em humanos. O primeiro estudo realizado em 8 indivíduos revelou que este composto chega a um pico de concentração plasmática superior a 1 $\mu\text{g/ml}$, 4 h após a infusão de 98 mg/m^2 de AU, i.v. nos indivíduos (XIA *et al.*, 2011).

A fim de melhorar a solubilidade e ação nos sistemas biológicos, diversos pesquisadores vêm sintetizando novas formulações derivadas do AU (LIU, 2005; LEAL *et al.*, 2012; DAR *et al.*, 2016; KASHYAP *et al.*, 2016). Em 2013 foram publicados os resultados do primeiro ensaio clínico realizado na China (Nº 2009L00634) que investigou a administração de lipossomas (ou nanolipossomas contendo AU, UANL) em 63 indivíduos (de 18 a 75 anos), sendo 4 pacientes com tumores sólidos avançados e 59 sujeitos saudáveis (WANG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013; QIAN *et al.*, 2015). Os autores reportaram que após uma única administração de UANL (37, 74, 98 e 130 mg/m^2) houve um pico de concentração de AU em 4 h no plasma humano dos indivíduos, um dado similar ao de trabalhos prévios (XIA *et al.*, 2011). Esta nova formulação foi bastante tolerada, no entanto, alguns indivíduos apresentaram diarreia, náusea e distensão abdominal, sendo que a dose máxima tolerada correspondeu a 98 mg/m^2 e alguns efeitos hepatotóxicos foram também relatados (WANG *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2013; QIAN *et al.*, 2015).

Outro estudo clínico avaliou o efeito da administração de AU na atrofia muscular em homens que realizavam um treinamento de resistência (BANG *et al.*, 2014). Neste estudo, 16 homens saudáveis (de

aproximadamente 28 anos) receberam uma dose diária de placebo ou de AU (3 cápsulas de 450 mg) via oral concomitantemente com um exercício de resistência durante 8 semanas (BANG *et al.*, 2014). Os autores reportaram que os sujeitos que receberam as doses diárias de AU apresentaram uma redução da gordura corporal e um aumento da força muscular sem alterar a massa do músculo esquelético (BANG *et al.*, 2014). Estes efeitos foram acompanhados por um aumento dos níveis de irisina e do fator de crescimento semelhante à insulina no sangue destes indivíduos (BANG *et al.*, 2014). Nesse sentido, uma série de estudos têm sugerido que o aumento da produção de irisina que é estimulado pelo exercício físico também pode estimular a produção de neurotrofinas no hipocampo (WRANN *et al.*, 2013), a neurogênese e a sinaptogênese em roedores (MOON *et al.*, 2013). Estes processos desempenham um papel na função cognitiva, na plasticidade sináptica e na memória, sendo assim alvos importantes no tratamento de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas (PHILLIPS *et al.*, 2014; JODEIRI FARSHBAF *et al.*, 2016). Portanto, existe a possibilidade de que o AU possa ter efeitos benéficos e terapêuticos relacionados com o sistema nervoso (SN) que sejam mediados em parte pela atividade periférica do AU no músculo esquelético.

Adicionalmente às evidências pré-clínicas que demonstram os efeitos antitumorais do AU (SHANMUGAM *et al.*, 2013), vários estudos têm sugerido a sua capacidade para modular alvos moleculares que participam no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e de transtornos psiquiátricos (descritos na seção 1.2.2 desta Tese). Ainda, estes alvos poderiam mediar o efeito neuroprotetor do AU frente à excitotoxicidade que se observa na doença de Parkinson (DP) ou na doença de Alzheimer (DA) (MONTEIRO *et al.*, 2017).

1.2.2 Estudos pré-clínicos dos efeitos do AU

1.2.2.1 Estudos sobre os efeitos neuroprotetores *in vitro* e *in vivo* do AU

Um dos primeiros estudos que investigou o efeito do AU *in vivo* sobre o SN foi conduzido por um grupo que mostrou o efeito antinociceptivo do AU em camundongos que receberam uma única dose deste composto (10 mg/kg, i.p.) (TAPONDJOU *et al.*, 2003). Estudos posteriores confirmaram estes achados (VASCONCELOS *et al.*, 2006; TAVIANO *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-TRUJANO *et al.*, 2012; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016), e um deles demonstrou que o sistema serotoninérgico parece estar envolvido no efeito antinociceptivo do AU, uma vez que este efeito comportamental foi prevenido pelo WAY100635 (antagonista de receptores de 5-HT_{1A}) (VERANO *et al.*, 2013). Utilizando um modelo de dor neuropática crônica, um grupo demonstrou que a administração de AU em roedores é capaz de prevenir até a hiperalgesia induzida por uma lesão crônica de constrição do nervo ciático e de prevenir a produção de citocinas inflamatórias no nervo ciático e na medula espinhal de ratos (LIU *et al.*, 2013; BHAT *et al.*, 2016). Neste contexto o AU foi capaz de regenerar o nervo ciático induzindo a remielinação e aumentando o diâmetro do nervo até 8 semanas após a lesão em camundongos (LIU *et al.*, 2013).

Diversos estudos também demonstraram o efeito do AU em modelos pré-clínicos de déficit cognitivo. Um deles demonstrou que a administração de AU a camundongos (tratamento durante 12 semanas de AU 10-20 mg/kg, p.o.) preveniu o dano cognitivo induzido pela administração de lipopolissacarídeos (WANG *et al.*, 2011), por uma dieta rica em gorduras (LU *et al.*, 2011) e frente à D-galactose (LU *et al.*, 2007;

LU *et al.*, 2010). Estes efeitos foram associados com uma produção reduzida de citocinas inflamatórias no hipocampo de camundongos (LU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011), efeitos antioxidantes no cérebro total de camundongos (LU *et al.*, 2007), uma redução da apoptose e da ativação da micróglia e dos astrócitos no córtex pré-frontal de camundongos (LU *et al.*, 2010). Além disso, os efeitos comportamentais foram acompanhados do aumento de proteínas relacionadas com a função de memória (como a proteína da densidade pós-sináptica 95) no hipocampo dos camundongos e pela ativação da cascata de sinalização dependente de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (LU *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos neuroprotetores do AU frente a um insulto induzido por uma hemorragia em ratos (ZHANG, SU, GUO, *et al.*, 2014; ZHANG, SU, WANG, *et al.*, 2014). Estes trabalhos demonstraram que a administração de uma única dose de AU (25 ou 50 mg/kg, i.p.) em ratos imediatamente após a indução da hemorragia cerebral levou à melhora da função neurológica, reduziu o edema cerebral e atenuou a permeabilidade da barreira hematoencefálica induzidos pela hemorragia (ZHANG, SU, GUO, *et al.*, 2014; ZHANG, SU, WANG, *et al.*, 2014). Além disso, estes efeitos foram associados com uma redução dos níveis protéicos e transcritos de fatores inflamatórios e um aumento da sobrevivência neuronal no córtex cerebral dos animais. Ainda, foi relatado que o tratamento com AU reduziu os níveis de malondialdeído e aumentou os níveis de glutatona (GSH) no córtex cerebral dos camundongos lesionados com a hemorragia (ZHANG, SU, GUO, *et al.*, 2014; ZHANG, SU, WANG, *et al.*, 2014).

Alguns estudos têm demonstrado os efeitos neuroprotetores do AU em modelos *in vitro* e *in vivo* de DP. O tratamento de células PC12

(Linhagem celular derivada de um feocromocitoma da medula suprarrenal de ratos) durante 48 h com AU (20-40 μM) previamente à incubação com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) por mais 24h (100 μM) teve um efeito antioxidante, uma vez que reduziu o conteúdo de componentes oxidativos como malondialdeído induzido por MPTP, e aumentou a glutathione e a atividade da enzima superóxido dismutase nas células (TSAI e YIN, 2008). Além dos efeitos antioxidantes, o AU reduziu os níveis de marcadores inflamatórios como a interleucina 6 e o fator de necrose tumoral α (TSAI e YIN, 2008). Estes achados foram reforçados por um estudo *in vivo*, no qual uma única administração de AU induziu uma melhora da resposta locomotora de camundongos que receberam MPTP pela via intraperitoneal (BROOKS e DUNNETT, 2009). Esta resposta foi associada com a redução da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo, aumento nos níveis dopamina e seus metabólitos, bem como aumento no número de células positivas para a enzima tirosina hidroxilase na região nigrostriatal dos camundongos (RAI *et al.*, 2016). Outro estudo avaliou o efeito neuroprotetor do AU frente ao dano mitocondrial em fibroblastos derivados de pacientes heterozigotos para *parkina* (um tipo familiar de DP) (MORTIBOYS *et al.*, 2008). Utilizando uma cultura primária derivada destes fibroblastos, o estudo demonstrou que o AU foi capaz de reverter o dano do potencial de membrana mitocondrial (Fig. 1.3) e estimulou a produção de adenosina trifosfato (ATP) sem causar efeitos citotóxicos nas células (YEALLAND *et al.*, 2016).

O efeito neuroprotetor e antioxidante do AU também foi demonstrado em um modelo *in vitro* de excitotoxicidade induzida pelo ácido kainico (AK) (Fig. 1.3), o qual atua como agonista de receptores ionotrópicos de glutamato do subtipo kainato (ZHENG *et al.*, 2011). Neste trabalho, com cultivos primários de neurônios hipocâmpais de ratos de 7

dias de idade, a incubação com AU (10 μ M) durante 10 min antes do insulto com AK (150 μ M) (SHIH *et al.*, 2004) foi capaz de proteger as células da morte celular avaliada pela captação de iodeto de propídeo (IP), reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), prevenir o dano nas membranas detectado pelo ensaio da liberação de lactato desidrogenase e de reduzir o dano mitocondrial induzido pelo AK (SHIH *et al.*, 2004). O efeito neuroprotetor do AU também foi verificado frente à neurotoxina ácido domoico derivada da diatomácea *Pseudo-nitzschia*, a qual mimetiza os efeitos neurotóxicos do AK (ZHENG *et al.*, 2011) (2 mg/ml durante 3 semanas, i.p.) em conjunto com o AU (100 mg/kg/dia). Neste estudo, os camundongos que receberam ácido domoico em conjunto com o AU exibiram um menor dano cognitivo, uma redução do estresse oxidativo e um aumento da atividade mitocondrial no hipocampo reduzido pelo ácido domoico (Fig. 1.3). Estes efeitos parecem ser mediados em parte pela cascata de sinalização dependente de PI3K/Akt (proteína cinase B) (WU *et al.*, 2013).

Alguns estudos também têm demonstrado que o AU poderia ser um agente terapêutico para a DA (HEO *et al.*, 2002; WILKINSON *et al.*, 2011; YOUN e JUN, 2012). A formação de placas de proteínas β amiloide ($A\beta$) é uma característica fisiopatológica desta doença e, estes fragmentos induzem um efeito neurotóxico causado pelo aumento de ERO, por mecanismos inflamatórios e uma consequente morte neuronal (TAKAHASHI *et al.*, 2017). Em um estudo de 2002, os pesquisadores demonstraram que o tratamento de células PC12 durante 48h com AU (0.1-10 μ M, isolado de *O. majorana*, Tabela 1) preveniu o efeito citotóxico de $A\beta$ (10 μ M incubadas durante 12h) e promoveu um efeito antioxidante frente à produção de ERO (Fig. 1.3) (HEO *et al.*, 2002) induzido por

fragmentos proteicos A β (Fig. 1.3). O AU também teve um efeito anti-apoptótico, uma vez que o AU inibiu a atividade da caspase 3 ativada em células PC12 tratadas com A β (Fig. 1.3) (HONG *et al.*, 2012). Outros trabalhos *in vitro* reforçaram estes achados e demonstraram que o efeito neuroprotetor do AU pode ser mediado em parte pela inibição de cascatas de sinalização dependentes das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Fig. 1.3) (YOON *et al.*, 2014) e da prevenção da transcrição e liberação de mediadores inflamatórios (YOON *et al.*, 2014) induzidos pelos peptídeos A β (Fig. 1.3).

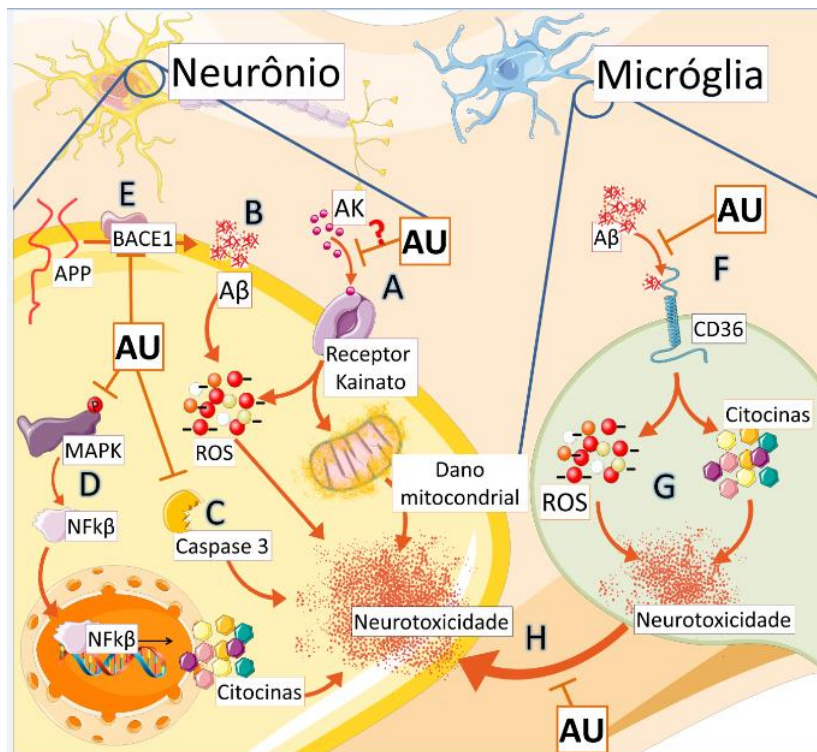
Os efeitos neuroprotetores do AU *in vitro* foram reforçados por estudos realizados em modelos animais mediante injeções intracerebroventriculares (i.c.v.) de peptídeos A β em roedores (NITTA *et al.*, 1994; TAKEDA *et al.*, 2009). Utilizando este modelo, já foi demonstrado que a administração de AU (10-40 mg/kg, p.o.) durante 11 dias após a administração via i.c.v. de A β em camundongos melhorou a função de memória dos animais (LIANG *et al.*, 2016) e induziu uma redução do estresse oxidativo e da produção de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo destes camundongos (LIANG *et al.*, 2016).

Além do efeito neuroprotetor do AU mediado por uma ação antioxidante e anti-inflamatória, já foi demonstrado que este composto parece atuar em células PC12 (YOUN e JUN, 2012) especificamente inibindo a enzima beta-secretase 1 (Fig. 1.3), cuja atividade promove o acúmulo de placas amiloides pela clivagem da proteína precursora amiloide (CHOW *et al.*, 2010).

Assim como os neurônios, as células da micróglia também respondem ao peptídeo A β secretando citocinas inflamatórias e agentes oxidantes que promovem, por sua vez, a neurotoxicidade nos neurônios que as cercam (STEWART *et al.*, 2010). Este mecanismo ocorre

principalmente pela união do peptídeo A β com o receptor CD36, um receptor expresso nos macrófagos e na micróglia (CORACI *et al.*, 2002) que, ao se ligar a estas proteínas amiloides forma um complexo com os receptores do tipo Toll 4-6 ativando assim mecanismos de estresse oxidativo e inflamatório (CORACI *et al.*, 2002). Neste sentido, já foi demonstrado que o AU (5-20 μ M) é capaz de bloquear de maneira competitiva a ligação de fragmentos A β com o receptor CD36 (Fig. 1.3) em culturas primárias de micróglia derivadas de camundongo e em células imortalizadas N9 (linhagem de células imortalizadas de micróglia derivada de camundongo) (WILKINSON *et al.*, 2011). Desta maneira, o AU foi capaz de prevenir a formação de ERO e a produção de citocinas inflamatórias (WILKINSON *et al.*, 2011) nas células da micróglia (Fig. 1.3), o que também levaria à proteção dos neurônios circundantes (Fig. 1.3).

Figura 1.3: Mecanismos de neuroproteção *in vitro* mediados pelo AU



O AU atua como neuroprotetor frente ao dano induzido por AK (A) e pelo acúmulo de Aβ (B). AU apresenta papel antioxidante contra a produção de ERO (A) e, pode reduzir o prejuízo da função mitocondrial induzido por AK (A). AU também pode prevenir a neurotoxicidade induzida pelos peptídeos Aβ devido a sua ação inibitória sobre a atividade da caspase 3 (C). O efeito inibitório do AU sobre a sinalização de MAPK pode mediar em parte o efeito neuroprotetor contra o peptídeo Aβ (D). Foi demonstrado que AU reduz a fosforilação da ERK1/2, c-Jun NH2-proteína quinase, e p38MAPK, bem como pode impedir a translocação do NFκB para o núcleo (D). AU também é capaz de reduzir a produção de citocinas inflamatórias (D) e de atuar inibindo a BACE1, envolvida na clivagem de APP, reduzindo assim o acúmulo de placas Aβ (E). AU previniu a neurotoxicidade induzida por mecanismos ativados em células microgliais, e estes efeitos podem ser mediados em parte pela inibição da ligação de Aβ à CD36 (F). Finalmente, o AU previne a formação de ERO e a produção e secreção de citocinas inflamatórias (G). O comprometimento das células microgliais, por sua vez, levaria a neurotoxicidade nos neurônios circundantes (H). *Abreviaturas: ácido kainico, KA; ácido ursólico, AU; proteínas β amiloide, Aβ; proteína precursora de amiloide,*

APP; beta-secretase 1, BACE1; espécie reativa de oxigênio, ERO; proteína cinase ativada por mitógenos, MAPKs; fator nuclear κB , NF κB . A figura foi produzida por Francis Pazini e modificada pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Além do efeito inibidor sobre a enzima beta-secretase 1, já foi sugerido que o AU possui atividade inibitória de maneira dose-dependente de a enzima acetilcolinesterase (Fig. 1.4) (CHUNG *et al.*, 2001). Esta enzima atua catalisando a degradação da acetilcolina, sendo que a redução deste neurotransmissor está diretamente correlacionado com a perda de neurônios colinérgicos no córtex cerebral e no hipocampo de pacientes com DA (BIRKS, 2006).

Estudos realizados por métodos de acoplamento molecular demonstraram que o AU possui uma alta afinidade sobre a enzima monoamina oxidase A (MAO-A) (Fig. 1.4) (SINGLA *et al.*, 2016), a qual catalisa a deaminação oxidativa das monoaminas (YOUDIM *et al.*, 2006). Além disso, uma avaliação *in silico* sugeriu que o AU poderia se ligar e inibir o transportador bacteriano derivado de leucina (SINGLA *et al.*, 2016), um homólogo dos transportadores de serotonina (5-HT), noradrenalina (NE), e dopamina (NYOLA *et al.*, 2010). Além disso, o AU pode inibir a atividade da monoamina oxidase B (MAO-B) (Fig. 1.4) (KIM *et al.*, 2012), uma enzima que oxida a feniletilamina e a dopamina (YOUDIM *et al.*, 2006). A literatura também reporta que o AU poderia ter uma ação inibitória sobre a enzima dopamina- β hidroxilase (DBH) (KIM *et al.*, 2012), a qual converte dopamina em NE (Fig. 1.4) (LEVIN *et al.*, 1960). Estas evidências sugerem que o AU poderia aumentar a biodisponibilidade das monoaminas no espaço sináptico por inibir a DBH, a MAO-A e a MAO-B (Fig. 1.4). Estas propriedades fazem do AU um composto com potencial terapêutico no tratamento da DP e do Transtorno Depressivo Maior (TDM) (YOUDIM *et al.*, 2006).

1.2.2.2 Evidências da modulação da via Nrf2/HO-1 no efeito neuroprotetor do AU

Uma série de trabalhos têm demonstrado o papel da cascata de sinalização dependente do fator eritróide nuclear 2 relacionado com o fator 2 (Nrf2) e de enzimas antioxidantes como a heme oxigenase 1 (HO-1) nos efeitos neuroprotetores do AU em modelos de isquemia cerebral (LI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016) e frente a um dano induzido pelo traumatismo encefálico (DING *et al.*, 2017) (Fig. 1.4).

Utilizando o modelo de isquemia cerebral, foi relatado que a administração aguda de AU em roedores imediatamente após a indução da isquemia melhorou a performance em um teste de avaliação neurológica, assim como promoveu a redução o tamanho da área infartada nos animais (LI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016). Estes efeitos foram associados com a redução do estresse oxidativo e a ativação de Nrf2, o que consequentemente elevou os níveis transcricionais da enzima HO-1 no cérebro total dos animais (LI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016). Além disso, o déficit cognitivo induzido pela isquemia cerebral em animais Nrf2^{-/-} não foi revertido pelo tratamento com AU (LI *et al.*, 2013).

Utilizando um modelo experimental de traumatismo encefálico, os autores demonstraram que uma administração única de AU (100-150 mg/kg, i.p.) foi capaz de reduzir o déficit cognitivo e o edema cerebral induzido pelo traumatismo encefálico (DING *et al.*, 2017). Ainda, estes efeitos comportamentais foram associados com a indução de Nrf2 e um aumento dos níveis de HO-1 e um reduzido estresse oxidativo assim como um aumento do número e a sobrevivência dos neurônios do córtex cerebral dos animais submetidos ao protocolo de traumatismo encefálico. Similar a

trabalhos prévios (LI *et al.*, 2013), o AU não apresenta efeito neuroprotetor em animais NRF2^{-/-} (DING *et al.*, 2017).

1.2.2.3 Evidências dos efeitos do AU em modelos animais de transtornos psiquiátricos

Em paralelo às ações neuroprotetores do AU frente a disfunção cognitiva e em processos neurodegenerativos no SNC, alguns estudos vêm sugerindo um possível efeito benéfico do AU frente a transtornos psiquiátricos. Esta hipótese se origina das evidências que demonstraram a ampla distribuição do AU em plantas que exercem efeitos tipo-antidepressivos em roedores. Além disso, vários estudos têm associado a presença do AU com estes efeitos comportamentais das plantas em roedores (Tabela 1). Por exemplo, o AU constitui um dos principais componentes do extrato metanólico derivado de folhas de *M. peltatus* (Tabela 1), as quais são bastante utilizadas como um agente terapêutico antidepressivo e ansiolítico pela tribo Onge das Ilhas indianas Andamão localizadas sobre o Oceano Índico (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2003).

Um dos primeiros estudos que investigou o efeito tipo-antidepressivo do AU em camundongos foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa e publicado em 2012 (MACHADO *et al.*, 2012). Neste estudo, os pesquisadores demonstraram que uma administração única de AU (derivado de *R. officinalis*, Tabela 1) em camundongos (0,1-10 mg/kg, p.o.) é capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais (MACHADO *et al.*, 2012) quando submetidos ao Teste de Suspensão pela Cauda (TSC) ou no Teste do Nado Forçado, dois testes preditivos para avaliar a ação tipo-antidepressiva de compostos (Ver seção 1.3.7) (KRISHNAN e NESTLER, 2011). De fato, o efeito tipo-antidepressivo do AU foi exercido em doses menores se comparado com o tratamento com fluoxetina, um

fármaco de ação antidepressiva e utilizado na clínica (MACHADO *et al.*, 2012). Este efeito comportamental do AU foi associado com a ativação de receptores dopaminérgicos do subtipo D₁ e D₂ (MACHADO *et al.*, 2012) (Fig. 1.4).

Estudos posteriores também conduzidos no nosso grupo de pesquisa confirmaram estes achados e também demonstraram que a combinação de doses sub-efetivas de AU com doses sub-efetivas de fluoxetina, bupropiona ou reboxetina (fármacos antidepressivos convencionais) exerceram um efeito tipo-antidepressivo sinérgico nos camundongos (COLLA *et al.*, 2014). Estes achados sugerem que o tratamento com AU poderia melhorar a eficácia dos antidepressivos convencionais. Adicionalmente, foi mostrado o papel chave dos sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos, mas não da neurotransmissão glutamatérgica ou sistema opioide no efeito tipo-antidepressivo do AU (Fig. 4) (COLLA *et al.*, 2014). Em conjunto, estes estudos evidenciaram que os efeitos tipo-antidepressivos do AU parecem envolver a participação da neurotransmissão monoaminérgica, uma característica chave dos compostos antidepressivos de recaptação tripla que atuam inibindo a recaptação de 5-HT, NE e DA (MARKS *et al.*, 2008). Esta característica faz do AU um composto com ação antidepressiva bastante promissora sendo que, os fármacos antidepressivos de recaptação tripla constituem uma classe mais nova de antidepressivos que promovem uma resposta mais rápida e possuem melhor eficácia se comparados com os fármacos inibidores da recaptação simples ou dupla de monoaminas (LIANG *et al.*, 2008).

Além da ação tipo-antidepressiva do AU, uma atividade tipo-ansiolítica e um efeito em comportamentos relacionados ao sono já foram demonstrados em camundongos (TAVIANO *et al.*, 2007; COLLA *et al.*,

2015; JEON *et al.*, 2015). Nesse sentido, um trabalho do nosso grupo de pesquisa evidenciou que, assim como o diazepam (fármaco ansiolítico de uso na clínica), a administração aguda de AU (em dose maior à da atividade tipo-antidepressiva, (10 mg/kg)) em camundongos exerceu um efeito tipo-ansiolítico nos animais submetidos ao Teste do Campo Aberto (TCA) e no labirinto em cruz elevado (COLLA *et al.*, 2015), ambos testes utilizados para avaliar atividade ansiolítica (KUMAR *et al.*, 2013). Além disso, o AU exerceu um efeito sedativo detectado pela redução do tempo de latência e o aumento da duração do sono em camundongos (TAVIANO *et al.*, 2007; JEON *et al.*, 2015). Em outro estudo, a administração de AU induziu um aumento dos níveis do neurotransmissor inibitório, ácido γ -aminobutírico no diencéfalo, mesencéfalo, na ponte e medula de camundongos (Fig. 1.4) (JEON *et al.*, 2015). Deve ser destacado que, a qualidade do sono cumpre um papel muito importante na manutenção da função do SNC (ANDERSON e BRADLEY, 2013), pelo qual transtornos relacionados com este processo estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos (ANDERSON e BRADLEY, 2013). Portanto, os efeitos benéficos e neuroprotetores do AU podem estar relacionados em parte com o seu efeito sedativo.

1.2.2.4 Evidências da ação do AU frente ao distresse em modelos *in vitro* e *in vivo*

A literatura tem evidenciado que a exposição crônica ao estresse e e processos de distresse (ver Seção 1.3.3 desta Tese) podem levar ao desenvolvimento de diversos transtornos psiquiátricos e neurodegenerativos (ESCH *et al.*, 2002). Nesse sentido, evidências provenientes de estudos *in vitro* avaliados em células NCI-H295R (células

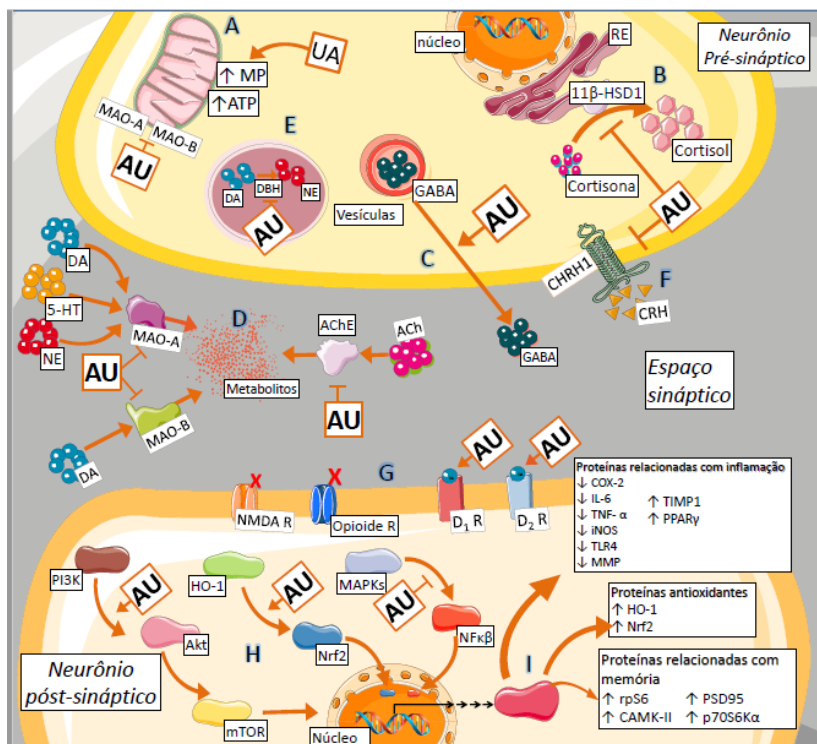
imortalizadas derivadas de adenocarcinoma humano) e em células CHO-K1 (células imortalizadas de ovário de hamster chinês) têm sugerido uma atividade protetora do AU frente ao distresse, sendo que este composto foi capaz de inibir a liberação de cortisol e atuou como antagonista dos receptores do tipo 1 do hormônio liberador de corticotrofina (CRHR1) (Fig. 1.4) sem causar efeito citotóxico (JOTHIE RICHARD *et al.*, 2016). O cortisol e o CRHR1 cumprem um papel chave na resposta ao estresse (ver Seção 1.3.3), sendo que uma alteração dos padrões de atividade de CRHR1 ou dos níveis de cortisol sistêmicos pode modificar a homeostase e função de diversos sistemas biológicos (CHAPMAN *et al.*, 2013) levando assim ao desenvolvimento de transtornos relacionados com o SNC.

Outro estudo identificou através de uma avaliação *in silico* uma série de grupos químicos que poderiam favorecer a interação entre o AU e o sítio catalítico da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11 β -HSD1) (ROLLINGER *et al.*, 2010), a qual atua convertendo a cortisona em cortisol ativo (Fig. 1.4) (ver Seção 1.3.3) (MORGAN *et al.*, 2009). Este efeito parece ter sido comprovado também em um modelo *in vitro*, no qual o AU foi capaz de inibir a atividade de 11 β -HSD1 em células HEK-293 (células embrionárias de rim humano) (JOTHIE RICHARD *et al.*, 2016).

As propriedades anti-estresse do AU também foram investigadas em modelos animais que induzem a expressão do fenótipo tipo-depressivo e mimetizam as características bioquímicas deste transtorno em camundongos (ver Seção 1.3.6). Por exemplo, já foi demonstrado que o tratamento crônico durante 7 dias com AU (0,1 mg/kg, p.o.) preveniu o comportamento tipo-depressivo no TSC e tipo-ansioso detectado no número de bolos fecais e o tempo de autolimpeza dos camundongos

submetidos a um protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI) (ver seção 1.3.6) (COLLA, 2015). Em paralelo a estes efeitos comportamentais, o tratamento com AU também preveniu o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica *bax* (proteína X associada à Bcl-2) (Ver seção 1.3.5) e reverteu a redução da razão *bcl-2* (*proteína 2 de linfoma de células B*)/*bax* no hipocampo dos camundongos induzidos pelo protocolo de ECI (COLLA, 2015). Além disso, o tratamento repetido durante 7 dias com AU (0,1 mg/kg, p.o.) exerceu efeitos tipo-ansiolítico no TCA, tipo-antianedônico detectado pelo teste de consumo de sacarose e tipo-antidepressivo no TSC nos camundongos que receberam uma administração crônica de corticosterona durante 21 dias (COLLA, 2015). Em termos bioquímicos, o tratamento crônico com AU preveniu a diminuição dos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) no córtex pré-frontal mas, à diferença da fluoxetina, o AU não preveniu a alteração nos níveis séricos de corticosterona induzidos pela administração de doses repetidas de corticosterona nos camundongos (COLLA, 2015). Estes estudos reforçaram a hipótese do efeito neuroprotetor do AU frente às alterações da resposta ao distresse em camundongos.

Figura 1.4: Alvos moleculares do AU no SNC



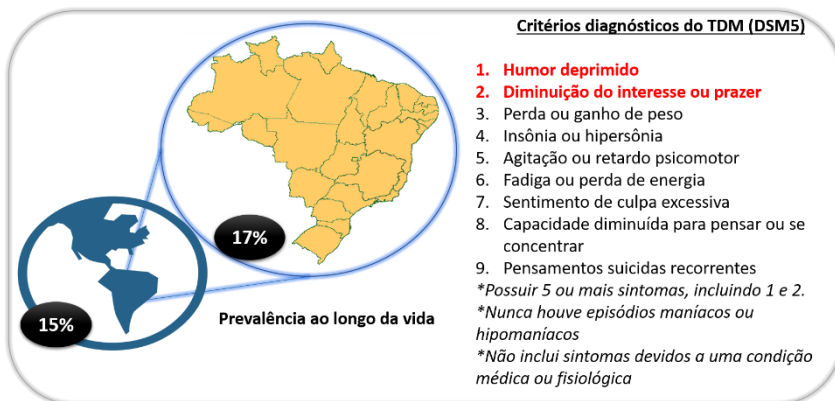
Diversos estudos reportaram que o AU pode atuar aumentando a produção de ATP e restaurando o potencial de membrana mitocondrial (A), AU também pode atuar inibindo 11 β -HSD1, assim prevenindo a produção de cortisol (B), AU foi capaz de induzir a liberação de GABA (C) e de inibir a atividade de MAO-A, MAO-B e AChE, o qual permite o acúmulo de monoaminas e acetilcolina na fenda sináptica (D), AU poderia inibir a atividade da DBH, o qual impede a conversão de dopamina em NE (E). Foi demonstrado que o AU pode atuar como antagonista, prevenindo a ligação de CRH com CHRH1 (F). Também foi mostrado que o AU poderia modular dopaminérgicos D₁ e D₂. (G). Alguns estudos sugerem que AU pode ativar a via PI3K/Akt/mTOR e Nrf2/HO-1, assim como inibir a atividade da sinalização dependente de MAPK/NF κ B (H). Estes sinais intracelulares podem mediar a produção de proteínas relacionadas com a memória, processos anti-inflamatórios e antioxidantes (I). Desta forma, a ação do AU reduziria a produção de elementos oxidantes e pró-inflamatórios. Abreviaturas: 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1, 11 β -HSD1; serotonina 5-HT; ácido ursólico, AU; acetilcolina, ACh; acetilcolinesterase, AChE; proteína cinase B, Akt; adenosina trifosfato, ATP; proteína cinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina, CaMKII; receptor de hormônio liberador de

corticotrofina tipo 1, CHRHI; hormônio liberador de corticotrofina, CRH; ciclooxigenase-2, COX-2; dopamina, DA; receptores de dopamina tipo 1 e 2, D₁, D₂; dopamina beta hidroxilase, DBH; ácido γ -aminobutírico, GABA; heme oxigenase 1, HO-1; interleucina 6, IL-6; óxido nítrico sintase induzível, iNOS; monoamina oxidase A, MAO-A; monoamina oxidase B, MAO-B; proteína cinase ativada por mitógenos, MAPK; metaloproteínas de matriz, MMP; potencial mitocondrial, MP; proteína alvo da rapamicina em mamíferos, mTOR; noradrenalina, NE; fator de transcrição nuclear kappa B, NF κ B; receptor de N-metil-D-aspartato, NMDAR; fator nuclear derivado de eritrócitos tipo 2, Nrf2; receptor opioide, Opioide R; proteína cinase ribossomal S6K1, p70S6 α ; fosfatidilinositol-3-cinase, PI3K; receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama, PPAR γ ; proteína de densidade pós-sináptica 95, PSD95; retículo endoplásmico, RE; proteína ribossomal S, rpS6; inibidor de metaloproteínases tecidual, TIMP1; receptor tipo toll, TLR; Fator de Necrose Tumoral alfa, TNF- α . A figura foi produzida por Francis Pazini e modificada pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

1.3 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR (TDM)

O TDM é considerado um dos problemas de saúde mais severos e devastadores de entre todos os transtornos psiquiátricos (OTTE *et al.*, 2016). A sua prevalência vem aumentando desde o começo do século XX e, estudos epidemiológicos têm demonstrado que aproximadamente 15% da população mundial é acometida por este transtorno (OTTE *et al.*, 2016). O Brasil é um dos países com maior incidência do TDM, estima-se que este transtorno acometeu aproximadamente 10% da população nos últimos 12 meses (OTTE *et al.*, 2016) e que 17% da população terá pelo menos um episódio depressivo na sua vida (BROMET *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014) (Fig. 1.5). Entre os sintomas clínicos relacionados à depressão encontram-se a perda de prazer pelas atividades diárias (anedonia), fadiga ou perda de energia, apatia, alterações cognitivas, psicomotoras, insônia, alterações do apetite e isolamento social (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013) (Fig. 1.5).

Figura 1.5: Prevalência do Transtorno Depressivo Maior (TDM) ao longo da vida e critérios de diagnóstico segundo o DSM5



Segundo BROMET et al., 2011, a prevalência ao longo da vida do TDM corresponde a 15% da população mundial. Segundo Silva et al 2014, a prevalência ao longo da vida do TDM no Brasil corresponde aproximadamente a 17% da população. Na tabela se descrevem os critérios diagnósticos utilizados para avaliar o TDM nos pacientes segundo o DSM5. *Abreviaturas: Transtorno depressivo maior, TDM; Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, DSM5.* A figura foi produzida pelo autor.

1.3.1 Mecanismos intracelulares responsáveis pelo desenvolvimento do TDM e na resposta aos antidepressivos

Dentre as diversas hipóteses neurobiológicas do TDM, a primeira a ser formulada constitui a teoria monoaminérgica, a qual estabelece que uma deficiência monoaminérgica (nos níveis de dopamina, 5-HT e NE e/ou dos seus receptores) no encéfalo poderia ser responsável pelo aparecimento de sintomas depressivos (COPPEN, 1967; HIRSCHFELD, 2000; NUTT, 2008).

De fato, a eficácia dos antidepressivos utilizados na atualidade é baseada principalmente nesta hipótese neurobiológica do TDM. No entanto, a fisiopatologia deste transtorno pode ser considerada altamente

heterogênea devido às numerosas causas e fatores que podem desencadear os episódios depressivos (LIEBLICH *et al.*, 2015). Portanto, muitos outros fatores tanto psicossociais e diversos outros fatores biológicos além dos relacionados com os níveis sinápticos de monoaminas, podem contribuir para o desenvolvimento do TDM. Por exemplo, fatores relacionados com a modulação neuroendócrina, imunológica, exposição a toxinas e altos níveis de EROs no sangue e no encéfalo de pacientes têm sido reportados como mediadores da fisiopatologia do TDM.

Ainda, a hipótese monoaminérgica não consegue explicar porque muitos pacientes não respondem aos agentes terapêuticos que modulam tal sistema de neurotransmissão, sendo que os níveis de remissão não chegam a superar o 30% dos pacientes (HOWLAND, 2008). Por exemplo, tem sido observado que uma depleção das monoaminas na fenda sináptica através de agentes farmacológicos nem sempre produz sintomas depressivos e que, um rápido incremento das monoaminas induzido pela administração de antidepressivos não se correlaciona diretamente com um efeito antidepressivo rápido (DELGADO, 2000; HIRSCHFELD, 2000). Corroborando este fato, diversos estudos relatam que existe um longo período entre o início do tratamento com fármacos antidepressivos e o efeito terapêutico que estes desencadeiam (TRIVEDI *et al.*, 2006).

Todas estas observações levaram à busca de novos alvos bioquímicos e hipóteses que expliquem a etiologia e a progressão deste transtorno (VAIDYA e DUMAN, 2001). Em particular, o tempo que decorre entre a administração dos antidepressivos e o seu efeito clínico sugere que sejam necessárias adaptações neuroquímicas a longo prazo nos sistemas de neurotransmissores e em seus alvos intracelulares para que ocorram os efeitos terapêuticos. Nesse sentido, sabe-se que a interação entre os neurotransmissores e seus receptores envolve a regulação de vias

de sinalização intracelulares e a produção de segundos mensageiros, os quais levam à ativação de fatores de transcrição e a síntese de neurotrofinas que afetam o funcionamento e a sobrevivência de neurônios (POPOLI *et al.*, 2000).

Entre os múltiplos efetores que participam deste mecanismo podemos destacar as proteínas cinases, proteínas que utilizam ATP para adicionar um grupamento fosfato a outras proteínas alvos. Desta maneira, as proteínas cinases modulam vias de sinalização e comunicação intracelular envolvidas na liberação de neurotransmissores, no ciclo celular e na expressão gênica (POPOLI *et al.*, 2000). A literatura relata que o padrão de fosforilação destas proteínas pode estar alterado no cérebro *post-mortem* e/ou em tecidos periféricos de pacientes acometidos pelo TDM e também parecem ter um papel no comportamento tipo-depressivo de animais submetidos a modelos experimentais de TDM (POPOLI *et al.*, 2000). Além disso, antidepressivos clássicos (como a fluoxetina, desipramine e imipramina) e compostos com atividade antidepressiva requerem da ativação de cinases como a PKA (proteína cinase A), PKC (proteína cinase C), CaMKII (Proteína cinase II dependente de Ca^{+2} /calmodulina), MEK/ERK (sinalização Ras-Raf-MEK-ERK) e a PI3K para exercerem seus efeitos (Fig. 1.6) (POPOLI *et al.*, 2000). Assim, o desenvolvimento do TDM pode ser associado a alterações na funcionalidade de proteínas no cérebro de pacientes que regulam a sobrevivência celular (DWIVEDI *et al.*, 2001; MALBERG e BLENDY, 2005; DWIVEDI *et al.*, 2006; DWIVEDI e PANDEY, 2008; SHELTON *et al.*, 2009; GALEOTTI e GHELARDINI, 2012). Deve ser notado que a interação de compostos antidepressivos com as cascatas de sinalização depende muito do composto antidepressivo em questão (DUMAN *et al.*, 2007).

A ativação de receptores metabotrópicos (como receptores serotoninérgicos subtipos 4, 6 e 7, β -adrenérgicos e D_1) a partir de neurotransmissores leva à ativação de uma proteína G estimuladora e transdutora de sinais (Fig. 1.6). Assim, esta proteína G se dissocia do complexo de transmembrana e ativa a adenilato ciclase, e este por sua vez promove a produção de um mensageiro secundário que converte ATP em AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico). Esta cascata de eventos promove um aumento na concentração de AMPc, o qual ativa a PKA. Por outra parte, a ativação de receptores 5-HT subtipos 1 e 5, adrenérgicos α_2 e D_2 levam à inibição da Proteína G e uma subsequente redução da atividade da sinalização dependente de AMPc. Em particular, PKA consiste em uma enzima composta por duas subunidades: duas regulatórias e duas catalíticas. Funcionalmente, a PKA está envolvida na síntese de neurotransmissores, na expressão de genes correlacionados com plasticidade neuronal, com a sobrevivência e a proliferação celular (GOULD e MANJI, 2002). Diversos estudos têm demonstrado que, uma desregulação da atividade e uma expressão reduzida de PKA pode estar diretamente relacionado com o desenvolvimento de sintomas depressivos (DWIVEDI e PANDEY, 2008), sendo que evidências neste sentido foram encontradas no córtex pré-frontal (área 10 de Brodmann) *post-mortem* de vítimas de suicídio (SHELTON *et al.*, 2009).

A via de sinalização intracelular mediada pela cascata de sinalização MEK/ERK pode ser ativada por mitógenos que se unem a receptores ligados a cinases que se autofosforilam e ativam uma via de sinalização que promove a proliferação, diferenciação e a divisão celular (Fig. 1.6) (SCHAEFFER e WEBER, 1999). Foi demonstrado que o efeito indutor da fluoxetina sobre a expressão de genes relacionados com a sobrevivência e a proliferação celular em culturas de astrócitos depende

em parte da ativação de cascatas mediadas por MEK (MERCIER *et al.*, 2004). Por outra parte, já foi demonstrado que uma única administração de fluoxetina não altera a fosforilação de ERK1/2 (cinase regulada por fatores extracelulares) no hipocampo, córtex cerebral ou estriado de ratos (FUMAGALLI *et al.*, 2005). Em contraste, no mesmo trabalho foi demonstrado que a administração durante 3 semanas com fluoxetina foi capaz de reduzir a fosforilação de ERK1/2 no hipocampo e no córtex cerebral de ratos (FUMAGALLI *et al.*, 2005). Neste mesmo trabalho, os autores relataram que a imipramina, outro antidepressivo de uso na clínica, não alterou a fosforilação de ERK1/2 no hipocampo mas aumentou a fosforilação no córtex cerebral dos ratos (FUMAGALLI *et al.*, 2005).

Outras vias de sinalização controladas por Proteínas G dependem da ativação e formação dos segundos mensageiros inositol trifosfato e diacilglicerol. O primeiro atua na liberação de Ca^{+2} , se liga à calmodulina (Fig. 1.6) e ativa CaMKII, uma das proteínas mais expressas no hipocampo (SWULIUS e WAXHAM, 2008). Esta proteína cinase está envolvida na modulação da síntese de neurotransmissores, excitose e na expressão gênica em neurônios (SWULIUS e WAXHAM, 2008). Além disso, a CaMKII é considerada como o principal componente mediador das funções de memória e aprendizado (LISMAN *et al.*, 2002). A CaMKII é uma proteína que tem sido implicada na fisiopatologia do TDM, sendo que o tratamento crônico de ratos com antidepressivos pode aumentar a fosforilação e atividade de CaMKII no hipocampo dos animais (VAIDYA e DUMAN, 2001; DU *et al.*, 2004; TIRABOSCHI *et al.*, 2004).

Outra proteína cinase ativada pelo aumento dos níveis Ca^{+2} ou de diacilglicerol e, cuja função também está relacionada com a fosforilação de resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) de proteínas alvo é a PKC (Fig. 1.6) (PARKER e MURRAY-RUST, 2004). Especificamente, no SN esta

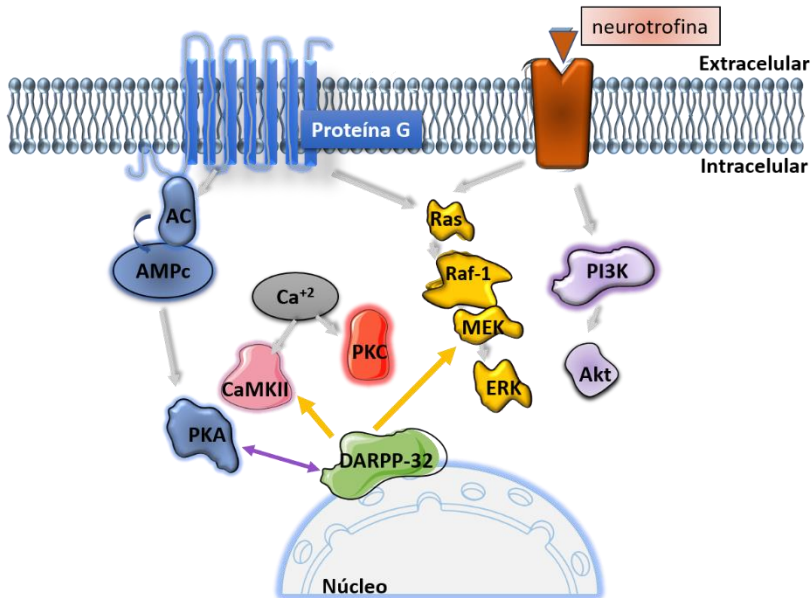
proteína regula funções neuronais como excitação frente à liberação de neurotransmissores como 5-HT e glutamato, crescimento e proliferação celular (KANASHIRO e KHALIL, 1998). Alguns estudos clínicos têm sugerido a participação da PKC na fisiopatologia do comportamento suicida, uma vez que em tecido cerebral (áreas 8 e 9 de Brodmann) *post-mortem* de vítimas de suicídio foi encontrado uma redução na sua atividade catalítica, no seu substrato e na sua expressão (PANDEY *et al.*, 1997). Além disso, já foi observado que existe uma redução da expressão de PKC no córtex pré-frontal de pacientes depressivos (SHELTON *et al.*, 2009).

Em resposta a fatores de crescimento, hormônios e citocinas, PI3K também pode ser ativada, a qual recruta e ativa proteínas como Akt (Fig. 1.6) (BRAZIL *et al.*, 2004). Assim, esta cascata de sinais está envolvida no metabolismo, no transporte de glicose, na proliferação e na morte celular (BRAZIL *et al.*, 2004). A via de sinalização mediada por PI3K/Akt tem sido implicada na produção de citocinas anti-inflamatórias, um alvo importante também na fisiopatologia do TDM (BRAZIL *et al.*, 2004). Além disso, alguns estudos têm implicado esta cascata em processos de plasticidade sináptica, aprendizado, memória e na modulação do humor (BUDNI *et al.*, 2012; KITAGISHI *et al.*, 2012).

A fosfoproteína neuronal dependente de AMPc e dopamina (DARPP-32) constitui um dos componentes celulares integradores da informação que chega dos neurônios dopaminérgicos (em diversos tecidos), de diversos neurotransmissores, neuropeptídeos e hormônios. Existe uma interação importante entre a DARPP-32 e a PKA (Fig. 1.6). Por exemplo, dependendo do seu estado de atividade, a DARPP-32 pode tanto ativar como inibir a fosforilação e atividade de PKA (Fig. 1.6). Além disso, diversos estudos têm relacionado a atividade de DARPP-32 com o desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos (TORRES *et al.*, 2009;

KUNII *et al.*, 2014) e com o comportamento tipo-depressivo em roedores (GUITART e NESTLER, 1992; SVENNINGSSON *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2007). É importante mencionar que, a 5-HT e a administração aguda ou crônica de fluoxetina incrementam a fosforilação do resíduo de Thr³⁴ e diminuem a fosforilação do resíduo de Thr⁷⁵ da DARPP-32 no hipocampo de camundongos (SVENNINGSSON *et al.*, 2002). Além disso, a ativação de DARPP-32 (como consequência da fosforilação do resíduo Thr³⁴) regula a fosforilação de outras cinases como CaMKII, ERK1/2 e PKA (Fig. 1.6) (SVENNINGSSON *et al.*, 2005; NICIU *et al.*, 2013) envolvidas em processos de adaptação neuronal pela inibição da proteína fosfatase 1, potencializando a transmissão dopaminérgica (YGER e GIRAULT, 2011).

Figura 1.6: Cascatas de sinalização intracelular envolvidas no desenvolvimento do TDM e na resposta aos fármacos antidepressivos



Os compostos antidepressivos modulam diversas vias de sinalização intracelular mediadas pela ativação da proteína G ou ligação de neurotrofinas aos seus receptores. Estes, uma vez ativados, podem modular várias vias de sinalização intracelulares, incluindo a via de AMPc/PKA. AMPc amplifica o sinal intracelular e leva à fosforilação e ativação de PKA. Uma via de sinalização dependente de sinais mitogênicos e modulada por antidepressivos é mediada por MAPK/ERK. Esta cascata de fosforilação começa quando Ras é ativada e fosforila Raf-1, o qual fosforila e ativa MEK e, este concomitantemente ativa outras cinases como ERK1/2. Além disso, a ação de antidepressivos pode depender da produção de segundos mensageiros como Ca^{+2} , o qual ativa CaMKII e PKC. Assim como a via MEK/ERK, PI3K/Akt pode ser ativada por sinais extracelulares e, está envolvida nos mecanismos de ação de fármacos antidepressivos. PKA também pode modular a atividade de DARPP-32. DARPP-32, por sua vez, promove um feedback positivo na via de AMPc/PKA assim como na atividade de MEK/ERK e CaMKII. Note-se que algumas vias e proteínas foram omitidas para maior clareza. *Abreviaturas: adenilato ciclase, AC; Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, AMPc; proteína cinase regulada por sinal extracelular, ERK; proteína cinase A, PKA; proteína cinase B, Akt; proteína cinase C, PKC; proteína ligadora de nucleotídeo guanosina, proteína G; fosfatidilinositol-3-cinase, PI3K; fosfoproteína neuronal dependente de AMPc e dopamina, DARPP-32; proteína cinase ativada por mitógeno, MEK; proteína*

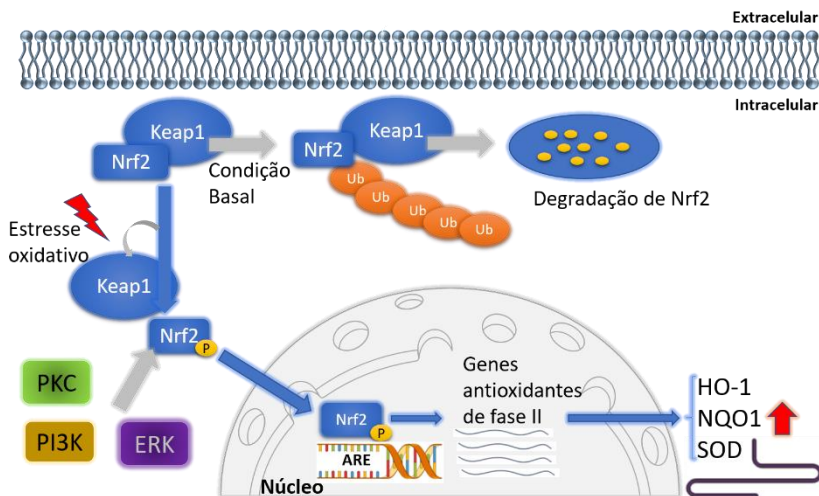
cinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina II, CaMKII; proteína treonina/serina cinase proto-oncogen RAF 1, Raf-1; RAt Sarcoma vírus, Ras. A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Além da alteração de monoaminas na fenda sináptica e de vias de sinalização intracelular, novos alvos e mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento do TDM já foram relatados. Por exemplo, estudos clínicos evidenciaram a existência de processos oxidativos, caracterizado pelo o aumento de EROs e/ou redução de defesas antioxidantes no soro e cérebro de pacientes acometidos pelo TDM (RYBKKA *et al.*, 2013; PALTA *et al.*, 2014; SPIERS *et al.*, 2014). Além disso, a literatura reporta que vários tratamentos antidepressivos poderiam atuar modulando vias de defesa antioxidante (ZAFIR *et al.*, 2009; BEHR *et al.*, 2012; SCAPAGNINI *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013) e que, o aumento destes elementos no cérebro como consequência do tratamento com antidepressivos, pode proteger e prevenir a expressão de comportamentos tipo-depressivo nos roedores (ZAFIR *et al.*, 2009; BEHR *et al.*, 2012).

A sinalização intracelular mediada pelo Nrf2 constitui um dos principais elementos de defesa frente ao estresse oxidativo (NGUYEN *et al.*, 2009). Como mostrado na Fig. 1.7, em condições basais o Nrf2 está localizado no citosol e associado a uma proteína repressora Keap1 (proteína 1 associada à proteína epiclorigrina tipo Kelch), que torna o Nrf2 inativo e leva a sua degradação proteossomal. Contudo, após a ativação de cinases como a PI3K (NAKASO *et al.*, 2003), PKC (ZHANG *et al.*, 2013) e ERK (XU *et al.*, 2006), Nrf2 pode ser fosforilado em resíduos de Ser ou Thr, o que induz a sua dissociação do complexo formado com Keap1 e permite a sua translocação para o núcleo (Fig. 1.7). No núcleo, o Nrf2 se liga ao elemento responsivo a antioxidantes (ARE) e assim induz a

transcrição e expressão de diversas enzimas detoxificantes de fase II, como a heme oxigenase 1 (HO-1), quinona oxidoreductase 1 e glutationa S-transferase (Fig. 1.7) (ALAM *et al.*, 1999).

Figura 1.7: Mecanismo de ativação da cascata de sinalização dependente de Nrf2/HO-1



Em condições basais, Nrf2 está associado com Keap1 no citosol, o qual consequentemente é marcado para ser degradado no sistema de ubiquitinação. Frente a um evento de estresse oxidativo, diversas proteínas cinase fosforilam Nrf2 e facilitam a liberação de Keap1. Como consequência, Nrf2 se transloca para o núcleo, onde promove a transcrição de genes antioxidantes de fase II e a tradução de enzimas antioxidantes. Note-se que algumas vias e proteínas foram omitidas para maior clareza. *Abreviaturas: elemento responsivo a antioxidantes, ARE; proteínas cinase reguladas por sinal extracelular, ERK; heme oxigenase 1; HO-1; proteína cinase C, PKC; fosfatidilinositol-3-cinase, PI3K; proteína 1 associada à proteína epícloridrina tipo Kelch, Keap1; fator nuclear derivado de eritrócitos tipo 2, Nrf2; NAD(P)H desidrogenase [quinone] 1, NQO1; superóxido dismutase, SOD; ubiquitina, Ub.* (Adaptado de (CHEN *et al.*, 2014). A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Dentre as enzimas induzidas por Nrf2, a heme oxigenase (HO) têm se destacado como um dos mediadores mais importantes da resposta celular antioxidante e em mecanismos de neuroproteção (SCHIPPER,

2000; LIN *et al.*, 2012; CHEN, 2014). A HO constitui uma proteína de choque térmico de 32kDa com diversas isoformas, sendo que a isoforma 2 constitui a forma constitutiva e a 1 a forma induzível frente a situações de estresse celular (MAINES *et al.*, 1986). A função catalítica de HO-1 consiste na degradação do cofator heme e na consequente formação de monóxido de carbono, Fe^{+2} e biliverdina, os quais funcionam como quelantes e sequestram radicais livres (SCHIPPER, 2000). A HO-1 também pode ser induzida por diversos agentes oxidantes, íons metálicos e citocinas inflamatórias (Fig. 1.7) (APPLEGATE *et al.*, 1991). Esta enzima está expressa no cérebro e em tecidos como o fígado, baço e rim (TENHUNEN *et al.*, 1969; EWING e MAINES, 1991). Em condições basais, a expressão de HO-1 é bastante baixa no cérebro de roedores (BARAÑANO e SNYDER, 2001; SCHIPPER, 2004), entretanto, ao ocorrer um insulto a expressão de HO-1 é induzida na micróglia e em alguns neurônios e astrócitos (LU e ONG, 2001; MUÑOZ *et al.*, 2005; SCHIPPER e SONG, 2015).

De fato, já foi descrito que camundongos *knockout* para Nrf2 (Nrf2^{-/-}) exibem um comportamento tipo-depressivo (MARTÍN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). Este fenótipo comportamental parece estar associado ainda com níveis reduzidos de dopamina e 5-HT e aumento dos níveis de glutamato no córtex pré-frontal desses animais (MARTÍN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). Além disso, a administração crônica de corticosterona já foi associada com uma redução dos níveis de Nrf2 no córtex cerebral e no hipocampo de ratos (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2015). Destaca-se que, o tratamento com a fluoxetina reverteu estes efeitos (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2015).

Diversas atividades neuroprotetoras mediadas pela HO-1 já foram relatadas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (LINKER *et al.*,

2011; CHEN *et al.*, 2013). Além disso, na literatura já foi evidenciado que, uma redução da expressão de HO-1 no soro e no sangue de pacientes pode estar correlacionada com o aumento de sintomas depressivos (RYBKA *et al.*, 2013; ROBACZEWSKA *et al.*, 2016). Por outra parte, a indução da expressão de HO-1 parece ser também um mediador importante da ação de antidepressivos de uso na clínica (ABDEL-WAHAB e SALAMA, 2011; MARTÍN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013) e de compostos que exercem ação tipo-antidepressiva em roedores (BETTIO *et al.*, 2014; MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2016). Por exemplo, um estudo demonstrou que a inibição de HO-1 preveniu o efeito tipo-antidepressivo do zinco, do ácido ascórbico e da creatina, no entanto, a combinação de doses sub-efetivas destes compostos com doses sub-efetivas de um indutor de HO-1 exerceu um efeito sinérgico e induziu um comportamento tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao TSC (MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2016; MANOSSO *et al.*, 2017).

A ativação de proteínas cinase e da enzima HO-1 está amplamente associada ao aumento da fosforilação do elemento de resposta à ligação do AMPc (CREB) (POPOLI *et al.*, 2000; KRÖNKE *et al.*, 2003; DI BENEDETTO *et al.*, 2007), o qual leva à transcrição e tradução de fatores neurotróficos (FIENBERG e GREENGARD, 2000; POPOLI *et al.*, 2000; QI *et al.*, 2014). Os fatores neurotróficos estão implicados nos processos de sobrevivência, proliferação e plasticidade neural, e correlacionados com a modulação do humor de indivíduos (HASHIMOTO *et al.*, 2004; DURIC e DUMAN, 2013). Além disso, sugere-se que a atividade de proteínas cinases e a síntese de fatores tróficos está também implicada na ação dos fármacos antidepressivos (SCHMIDT *et al.*, 2008). Neste sentido, o TDM vem sendo associado a uma disfunção neurotrófica, a qual pode levar a

alterações particularmente na anatomia e na função das estruturas límbicas encefálicas que controlam o humor (BANASR *et al.*, 2011).

1.3.2 O papel do hipocampo no TDM

A diversidade de sintomas característicos do TDM pode ser em parte um reflexo das alterações em diversas regiões encefálicas (HOROWITZ, 2016). Nesse sentido, diversos estudos de imagem e em tecidos *post-mortem* de pacientes com TDM têm revelado a existência de alterações anatômicas no córtex pré-frontal, no córtex cingulado, estriado, amígdala, tálamo e hipocampo destes indivíduos (DREVETS *et al.*, 1997; RAJKOWSKA *et al.*, 1999; RAJKOWSKA, 2000; LIOTTI e MAYBERG, 2001; MIGUEL-HIDALGO e RAJKOWSKA, 2003; SAMUELS e HEN, 2011). Estas regiões encefálicas parecem interagir funcionalmente, sendo que qualquer alteração em alguma das regiões pode explicar a complexidade dos sintomas depressivos (SAMUELS e HEN, 2011).

Em particular, o hipocampo constitui a maior região do sistema límbico, o qual inclui também a amígdala, a área septal, o hipotálamo e o córtex cingulado, todas regiões chave no processamento do humor (RAJMOHAN e MOHANDAS, 2007). A função do hipocampo está associada principalmente a formação de memórias e a navegação espacial, mas também já foi associada a regulação do estresse (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004). Alterações nesta região estão envolvidas no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e de transtornos psiquiátricos (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; EGELAND *et al.*, 2015). Desta maneira, a função hipocampal pode ser dividida segundo dois domínios principais: uma região dorsal cuja principal função é a modulação cognitiva (memória) e a região ventral que controla a emoção e a resposta ao estresse (FANSELOW e DONG, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado o papel do hipocampo na fisiopatologia do TDM e na resposta aos fármacos antidepressivos. Alguns trabalhos demonstraram que lesões no hipocampo ventral (HENKE, 1990) ou dorsal (FANSELOW e DONG, 2010) podem levar a alterações do humor e na resposta ao estresse. Nesse sentido, vários estudos vêm evidenciando o fato de que pacientes com TDM apresentam uma redução e/ou perda de até 10% (VIDEBECH e RAVNKILDE, 2004) do volume hipocampal (COLE *et al.*, 2011), principalmente em casos de depressão recorrente (SHELIN *et al.*, 1996; SHELIN *et al.*, 1999; BREMNER *et al.*, 2000; MACQUEEN *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2004; MCKINNON *et al.*, 2009; ARNONE *et al.*, 2013). Esta atrofia hipocampal também foi descrita no hipocampo de roedores submetidos a modelos experimentais, nos quais foram induzidos comportamentos tipo-depressivos (CZÉH *et al.*, 2001; DUMAN e LI, 2012). Em alguns casos, esta atrofia hipocampal está associada tanto com o aparecimento de sintomas depressivos quanto com disfunções cognitivas observadas nos pacientes e em modelos pré-clínicos (VON GUNTEN *et al.*, 2000). Mais importante ainda, o tratamento com antidepressivos é capaz de reverter a atrofia hipocampal em roedores (MAGARIÑOS *et al.*, 1999; MALBERG *et al.*, 2000) e de pacientes com TDM avaliados em estudos de imagem (YOUNG, 2002; SHELIN *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2004; ARNONE *et al.*, 2013). Neste ponto, o hipocampo representa uma região de convergência entre diversos sistemas biológicos no desenvolvimento do TDM e na resposta aos fármacos antidepressivos (HOROWITZ, 2016).

Diversas hipóteses surgiram para explicar esta atrofia do hipocampo (SAPOLSKY, 2000; 2015). Por exemplo, alguns estudos evidenciaram uma associação entre a diminuição dos níveis de neurotrofinas no hipocampo e o comportamento tipo-depressivo de roedores ou com os

sintomas depressivos em pacientes (BAYER *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001; DUMAN e MONTEGGIA, 2006; DUMAN e LI, 2012). Além desta hipótese neurotrófica, outros estudos sugerem que o distresse pode desencadear um efeito neurotóxico nesta região encefálica.

1.3.3 O efeito do distresse no hipocampo e seu papel no desenvolvimento do TDM

O neurobiólogo Philip W. Gold foi pioneiro em estudar a resposta ao estresse e o primeiro em postular a hipótese neuro-hormonal, o qual sugere que o TDM poderia se desenvolver como consequência de alterações na resposta ao estresse (GOLD *et al.*, 1988).

A resposta ao estresse constitui uma resposta fisiológica frente a situações ameaçadoras que permite a adaptação, a preparação do organismo e manter a homeostasia. Esta resposta é mediada pela ativação do SN simpático e do eixo neuroendócrino hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Fig. 1.8) (MCEWEN *et al.*, 2015). Em resposta ao estresse, os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (Fig. 1.8A), o qual se liga a CRHR1 na glândula pituitária da hipófise anterior (Fig. 1.8B). A ativação deste receptor, por sua vez, estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico que, ao chegar à glândula suprarrenal (Fig. 1.8C) estimula a síntese e a liberação de glicocorticóides da zona fasciculata desta glândula para a corrente sanguínea (Fig. 1.8E). Os glicocorticóides também podem ser sintetizados a partir de cortisona e outros esteroides pela enzima 11β -HSD1 em diversos tecidos incluindo o hipocampo, adrenal, fígado e tecido adiposo (Fig. 1.8D) (YAU e SECKL, 2012). Finalmente, os glicocorticóides promovem efeitos sistêmicos como a regulação do metabolismo, da atividade anti-inflamatória e

imunossupressora, que medeiam a resposta fisiológica frente ao estresse e a qual finaliza no hipocampo mediante um sistema de retroalimentação negativa (Fig. 1.8F). O principal glicocorticóide em primatas é o cortisol, enquanto que, a corticosterona corresponde ao principal glicocorticóide em roedores (GOOSENS e SAPOLSKY, 2007).

A resposta intracelular aos glicocorticóides está mediada principalmente pela atividade de dois subtipos de receptores de glicocorticóides: receptores de mineralocorticoides (MR) e receptores de glicocorticóides (GR) (Fig. 1.8G). Dependendo das concentrações de glicocorticóides, estes ativam MR ou GR, devido às diferenças de afinidade destes pelos hormônios (Fig. 1.8G e 1.9), sendo que MR possui uma alta (até 10 vezes maior) e GR uma baixa afinidade, correspondentemente (ANACKER *et al.*, 2011). Por tanto, em concentrações baixas de glicocorticóides, são ocupados principalmente os sítios de ligação de MR, enquanto que frente a concentrações altas de glicocorticóides, estes hormônios se ligam nos sítios de ligação de MR e também, a continuação nos de GR (MCEWEN *et al.*, 2015).

Na ausência de glicocorticóides, GR encontra-se inativo no citosol formando um complexo com outras proteínas (MCEWEN *et al.*, 2015). Assim que o glicocorticóide ingressa na célula, o GR dissocia-se do complexo e torna-se ativado. Este mecanismo permite que GR se transloque para o núcleo e se ligue ao elemento responsivo a glicocorticóides (GRE) mediante o domínio central de ligação ao DNA na região do promotor do gene alvo. Esta resposta genômica modula a transativação de genes alvo anti-inflamatórios ou a transrepressão de genes de resposta pró-inflamatória (MCEWEN *et al.*, 2015). Além disso, GR interage e modula a função de diversos fatores de transcrição incluindo o fator de transcrição nuclear kappa B e atua na remodelação da cromatina

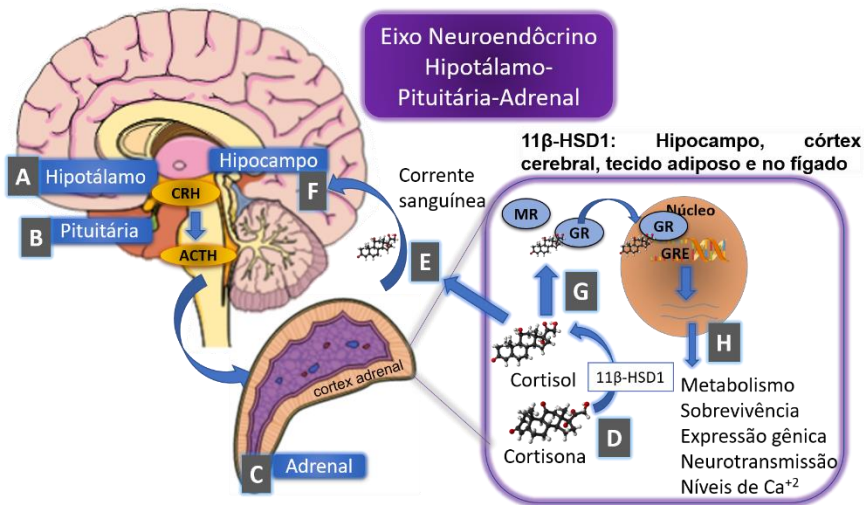
(Fig. 1.8H). Alternativamente, os glicocorticóides atuam modulando mecanismos rápidos não genômicos que incluem a ativação de proteínas anti-inflamatórias, alteração dos níveis de Ca^{+2} , atividade de proteínas cinase, inibição da fosforilação oxidativa e redução da produção de ATP (Fig. 1.8H) (FARIA e LONGUI, 2006; STAHN e BUTTGEREIT, 2008).

A literatura relata que baixas concentrações de glicocorticóides promovem uma ação neuroprotetora (MCEWEN *et al.*, 2015), sendo que a ação destes hormônios é essencial para o desenvolvimento neural, a diferenciação e a manutenção da função neural. Inclusive, concentrações de glicocorticóides (de até 300 nM) exercem efeitos neuroprotetores frente a insultos neurotóxicos induzidos pelos peptídeos A β e o NMDA. Estes efeitos parecem ser mediados pela ativação de MR, o qual leva à produção de neurotrofinas e promove também efeitos antioxidantes (ABRAHAM *et al.*, 2001). Entretanto, altas concentrações de glicocorticóides (maior a 300 nM) levam a uma redução da excitabilidade e à neurotoxicidade principalmente dos neurônios da região CA1 no hipocampo de ratos (ABRAHÁM *et al.*, 2006; MCEWEN *et al.*, 2015).

O aumento exacerbado de glicocorticóides pode estar relacionado com alterações na função do eixo HPA e na resposta ao estresse, como consequência de uma disfunção do estado fisiológico e psicológico do organismo conhecida como distresse, onde há uma falha na resposta adaptativa a situações ameaçadoras que ocorrem de forma aguda e/ou crônica (MOBERG, 1987). Em situações de exposição a estímulos estressores de maneira recorrente e crônica, os níveis de glicocorticóides aumentam excessivamente ou por longos períodos, provocando falhas na expressão e na atividade de GR e MR e, em consequência nos mecanismos de retroinibição, o qual leva a uma hiperativação persistente do eixo HPA (SAPOLSKY, 2015). Alguns estudos demonstraram que os sintomas

depressivos podem ser desencadeados por uma alteração da reatividade do eixo HPA (YOUNG *et al.*, 1994), o qual pode também modificar a resposta do paciente ao tratamento com antidepressivos (YOUNG *et al.*, 2004). Acredita-se ainda que o distresse seja responsável pelo desenvolvimento da maioria dos casos de TDM (HAMMEN, 2005). A literatura relata também que o distresse está associado a uma diminuição de fatores tróficos e a uma conseqüente perda de neurônios e atrofia de estruturas encefálicas, em especial do hipocampo (SMITH *et al.*, 1995; GREISEN *et al.*, 2005). Estas evidências surgiram a partir de estudos com modelos experimentais de estresse crônico, onde foi observado que o comportamento tipo-depressivo em roedores e em primatas não humanos estava associado com a redução do volume hipocampal (UNO *et al.*, 1994; CZÉH *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2001; LUCASSEN *et al.*, 2001; KRISHNAN e NESTLER, 2011; MORETTI *et al.*, 2012).

Figura 1.8: Funcionamento e regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)



O funcionamento do eixo HPA começa quando o hipotálamo secreta o CRH para a hipófise anterior onde estimula a síntese e liberação de ACTH. Este por sua vez,

é liberado na corrente sanguínea e atua no córtex da glândula suprarrenal, onde estimula a secreção de hormônio cortisol, quem chega até o hipocampo e atua na finalização da resposta. Em diversos tecidos, o cortisol é sintetizado a partir da oxidação de cortisona mediado pela 11β -HSD1 (que se encontra no hipocampo, córtex cerebral e nos tecidos adiposo e fígado). Nos tecidos alvo, o cortisol se liga e ativa os receptores GR ou MR, os quais se translocam para o núcleo da célula e se ligam aos elementos de resposta a glicocorticóides promovendo a transcrição gênica e gerando uma série de respostas sistêmicas dependendo da concentração e da função do eixo HPA. *Abreviaturas: 11β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1, 11β -HSD1; hormônio adrenocorticotrófico, ACTH; receptor de glicocorticoide, GR; elemento responsivo a glicocorticóides, GRE; hormônio liberador de corticotrofina, CRH; receptor de mineralocorticoide, MR* (Adaptado de (YAU e SECKL, 2012). A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Mind the Graph” (www.mindthegraph.com).

O hipocampo constitui um dos principais alvos de ação dos glicocorticóides no SNC (MCEWEN *et al.*, 2015) devido ao fato de que tanto o hipocampo de roedores (REUL e DE KLOET, 1985; MORIMOTO *et al.*, 1996; NISHI *et al.*, 2007) quanto o de humanos (WANG *et al.*, 2013) expressam alto conteúdo de GR e MR, o que evidencia a sensibilidade destes tecidos aos efeitos deletérios do excesso de glicocorticóides. Além disso, o hipocampo é uma das regiões que controla os mecanismos de retroinibição do eixo HPA responsáveis pela normalização dos níveis de glicocorticóides e o fim da resposta ao estresse (Fig. 1.8). Portanto, um aumento da atividade do eixo HPA combinado com um bloqueio do mecanismo de retroalimentação negativo próprio deste sistema pode levar a um dano neuronal, uma perda do controle da liberação de CRH, e da atividade dos receptores correspondentes principalmente no hipocampo. Em consequência, esta cascata de eventos resulta em um aumento continuado dos níveis de glicocorticóides que induz um dano no tecido (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004).

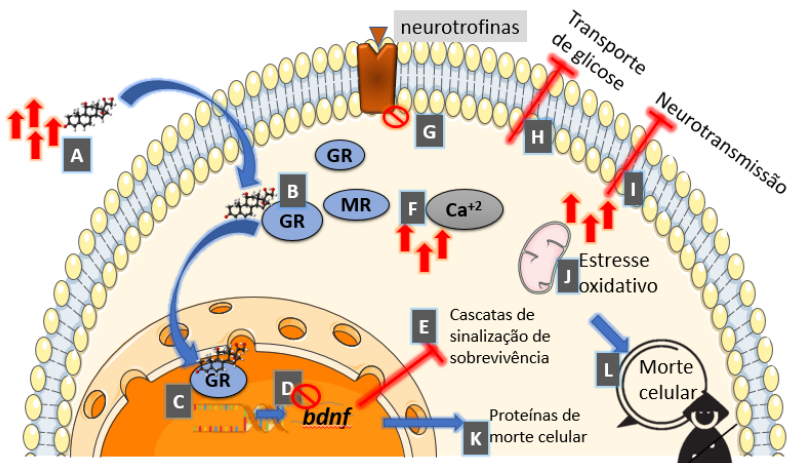
Uma série de estudos reportaram que a produção excessiva de glicocorticóides, como resultado da exposição a situações de distresse e

da hiper-reatividade do eixo HPA, pode danificar o tecido hipocampal de animais (SAPOLSKY *et al.*, 1985; UNO *et al.*, 1989; SAPOLSKY *et al.*, 1990). O primeiro estudo que demonstrou uma correlação negativa entre o excesso nos níveis de glicocorticóides e a redução importante do volume hipocampal em primatas que sofriam de situações crônicas de distresse foi publicado em 1994 (UNO *et al.*, 1994). Além disso, diversos estudos evidenciaram uma correlação negativa entre a exposição ao distresse e o volume hipocampal de pacientes depressivos quando comparado com o volume hipocampal de pacientes saudáveis (BREMNER *et al.*, 1995; GILBERTSON *et al.*, 2002; VYTHILINGAM *et al.*, 2002). Estes achados também foram observados em indivíduos com hipercortisolemia (BREMNER *et al.*, 1995; STARKMAN *et al.*, 1999; LUCASSEN *et al.*, 2001; GEERLINGS e GERRITSEN, 2017). De fato, a redução dos níveis de corticosterona após o tratamento de pacientes com síndrome de Cushing (mediante a ressecção cirúrgica de uma parte da glândula pituitária), ou após um procedimento de adrenalectomia em ratos é capaz de reverter a perda neuronal e a atrofia do hipocampo induzida pelo nível excessivo de corticosterona (STEIN e SAPOLSKY, 1988; CAMERON e MCKAY, 1999; STARKMAN *et al.*, 1999). Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos clássicos pode atuar como neuroprotetor e é capaz de reverter algumas destas alterações bioquímicas, estruturais e comportamentais relacionadas ao distresse (VINET *et al.*, 2004; PITTENGER e DUMAN, 2008; BRAVO *et al.*, 2009; MORETTI *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2016).

1.3.4 Mecanismos celulares e moleculares do efeito neurotóxico de glicocorticóides no hipocampo

O mecanismo subjacente aos efeitos neurotóxicos dos níveis exacerbados de glicocorticóides (Fig. 1.9A) no hipocampo ainda não foram totalmente elucidados, entretanto sabe-se que estes efeitos são mediados pela ativação de GR (Fig. 1.9B-C), que promove nas células a inibição do transporte de glicose (Fig. 1.9H), alteração da transmissão sináptica (Fig. 1.9I), exacerbção da sinalização glutamatérgica e alteração da concentração intracelular de Ca^{+2} (Fig. 1.9F) (SAPOLSKY *et al.*, 1985; SAPOLSKY, 2000; CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; SAPOLSKY, 2015). Entretanto, um bloqueio da produção de neurotrofinas induzido pelos glicocorticóides (Fig. 1.9D) é capaz de alterar as cascatas de sinalização intracelular envolvidas na sobrevivência celular (Fig. 1.9E-K) (SAPOLSKY, 2015). Como consequência da redução de mitógenos (Fig. 1.9G), tem sido reportado que os glicocorticóides induzem a parada do ciclo celular em células de osteosarcoma humano (ROGATSKY *et al.*, 1997). Outro estudo já demonstrou que o tratamento de neurônios derivados de hipocampo de ratos com dexametasona (glicocorticóide sintético e ligante de GR) induz o bloqueio da transcrição de *bdnf* (Fig. 1.9D) (COSI *et al.*, 1993). Ainda, o excesso de glicocorticóides pode diminuir as defesas antioxidantes e promover a geração de EROs (Fig. 1.9J), dano no DNA e disfunção mitocondrial nos neurônios hipocâmpais (SAPOLSKY, 2015). Como consequência, a exposição a glicocorticóides aumenta a sensibilidade de neurônios a posteriores insultos e a perda da resposta ao glicocorticóides (STEIN-BEHRENS *et al.*, 1994; MCEWEN *et al.*, 2015). Finalmente, estes fatores podem levar os neurônios à disfunção e morte (Fig. 1.9L) (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; KOSTEN *et al.*, 2008).

Figura 1.9: Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na neurotoxicidade induzida pela corticosterona



Níveis exacerbados de glicocorticóides promovem a ativação do receptor GR, o qual se transloca para o núcleo e induz a transcrição de genes e a tradução de proteínas relacionadas com a morte celular. Além disso, a ativação de GR inibe a produção de BDNF, inibe a atividade de proteínas cinase envolvidas na sobrevivência celular, o transporte de glicose e promove a disfunção da neurotransmissão, altera a homeostase de Ca^{+2} e aumenta a produção de ERO. Todos estes eventos levam à disfunção e morte celular. *Abreviaturas: fator neurotrófico derivado de encéfalo, bdnf; receptor de glicocorticoide, GR; receptor de mineralocorticoide, MR.* A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

1.3.5 Mecanismos de morte celular envolvidos na neurotoxicidade dos glicocorticóides

Existem diversos tipos de mecanismos de morte celular, os quais podem ser globalmente caracterizados como: necrose ou apoptose (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). Em particular, a necrose consiste em um tipo de morte celular no qual as células recebem um dano que promove principalmente a desorganização do citoplasma, a perda da integridade da membrana plasmática e uma consequente ruptura celular que causa a liberação do conteúdo citosólico, o qual promove danos nos tecidos

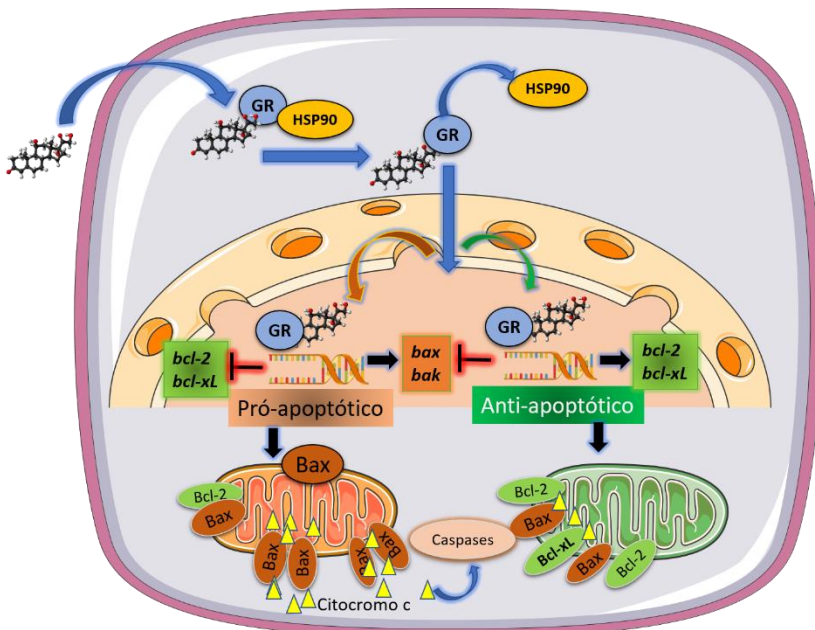
circundantes (FINK e COOKSON, 2005). Dependendo dos níveis de glicocorticóides, em alguns casos é possível observar a morte celular por necrose (REAGAN e MCEWEN, 1997).

A diferença da necrose, que não requer de gasto energético ou de uma orquestra de mecanismos moleculares, a apoptose constitui um processo de morte celular programada (FINK e COOKSON, 2005). Do ponto de vista celular, este tipo de morte é caracterizado pela retração celular, o qual promove a perda da adesão à matriz extracelular e das células circundantes. Além disso, pode ser observada a disfunção de organelas, a condensação da cromatina e prolongamentos da membrana celular e do núcleo, os quais se desintegram e formam fragmentos ou corpos apoptóticos. Estes corpos apoptóticos podem ser fagocitados e removidos pelas células do sistema imune (FINK e COOKSON, 2005). Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado que neurônios derivados do tecido hipocampal expostos a concentrações tóxicas de glicocorticóides parecem ter aspecto e morfologia de apoptose (Fig. 1.10) (HASSAN *et al.*, 1996; REAGAN e MCEWEN, 1997).

Em termos moleculares, o processo apoptótico induzido pelos glicocorticóides pode ser mediado pela ativação de GR (Fig. 1.10) (GOULD e CAMERON, 1996; HASSAN *et al.*, 1996; ALMEIDA *et al.*, 2000). A ativação deste receptor pode levar à modulação da via intrínseca da apoptose, a qual é regulada principalmente por proteínas da família Bcl-2 (FINK e COOKSON, 2005). Entre elas, as proteínas Bcl-2 e a proteína 2 de linfoma de células B extralarga são consideradas anti-apoptóticas e estas inibem a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol (Fig. 1.10). Quando a célula recebe sinais para entrar em apoptose ou como consequência da ausência ou da deficiência de fatores de sobrevivência (Fig. 1.10), na presença de danos irreversíveis ao DNA e frente a uma

disfunção da homeostasia intracelular de Ca^{+2} , as proteínas 1 antagonista/exterminadora de Bcl-2/Bax (proteínas pro-apoptóticas) se translocam para a mitocôndria e ativam a liberação de citocromo c, o qual em consequência ativa uma cascata de sinalização intracelular mediada por caspases que modula a morte celular (Fig. 1.10) (YOULE e STRASSER, 2008). Em alguns casos, a função de Bax é bloqueada quando forma um complexo com Bcl-2 (Fig. 1.10), entretanto, quando as proteínas pró-apoptóticas induzem a liberação do citocromo c, estas são capazes de se ligar ao fator de ativação de protease associada à apoptose 1 e a caspase-9, ativando a cascata de caspases efetoras (Fig. 1.10) (FINK e COOKSON, 2005).

Figura 1.10: Mecanismos anti e pró-apoptóticos induzidos pela corticosterona



A sinalização dependente da ativação de GR pode atuar como neuroprotetor ou neurotóxico dependendo da concentração e do tecido alvo. Por um lado, a corticosterona atua induzindo a transcrição de proteínas pró-apoptóticas e

inibindo proteínas anti-apoptóticas, o que conduz à formação de homodímeros de Bax na membrana mitocondrial, o qual promove a liberação de citocromo c e a consequente ativação da cascata de sinalização depende de caspases. Por outra parte, uma concentração baixa de corticosterona atua como protetora ao induzir a transcrição de proteínas anti-apoptóticas e inibir proteínas pró-apoptóticas. *Abreviaturas: proteína X associada à Bcl-2, bax; proteína 1 antagonista/exterminadora de Bcl-2, bak; Proteína 2 de linfoma de células B, bcl-2; Proteína 2 de linfoma de células B extralarga, bcl-xl; receptor de glicocorticoide, GR; proteína de choque térmico 90, HSP90. (Adaptado de (GRUVER-YATES e CIDLOWSKI, 2013)).* A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

A morte celular por apoptose já foi observada no córtex entorrinal, hipocampo (giro dentado, regiões CA1 e CA4) e subículo de pacientes com TDM (LUCASSEN *et al.*, 2001; DUMAN, 2004; KOSTEN *et al.*, 2008). Além disso, já foi demonstrado que as proteínas relacionadas com a apoptose são expressas no hipocampo (LI *et al.*, 2010) e que, o mecanismo neurotóxico de glicocorticóides parece ser mediado em parte pela indução do incremento dos níveis de Bax e da redução de Bcl-2 (ALMEIDA *et al.*, 2000). Um estudo revelou uma alta frequência de um polimorfismo no gene *bcl-2* (relacionado com uma redução dos níveis de Bcl-2) em pacientes com TDM resistentes ao tratamento (ZHANG, C. *et al.*, 2014). Entretanto, o aumento da expressão de *bax* está relacionada com a DP (TATTON *et al.*, 2003), DA (SU *et al.*, 1997) e em transtornos psiquiátricos (MANJI *et al.*, 2012). A ativação de Bax já foi associada em modelos de indução do fenótipo tipo-depressivo em roedores (WANG *et al.*, 2011). Além disso, já foram relatados polimorfismos no gene que codifica para a fator de ativação de protease associada à apoptose 1, o qual promove uma maior predisposição ao TDM (HARLAN *et al.*, 2006). Por outro lado, o tratamento com antidepressivos é capaz de estimular a expressão de proteínas anti-apoptóticas no hipocampo de camundongos (MURRAY e HUTSON, 2007). Contudo, deve ser destacado que o

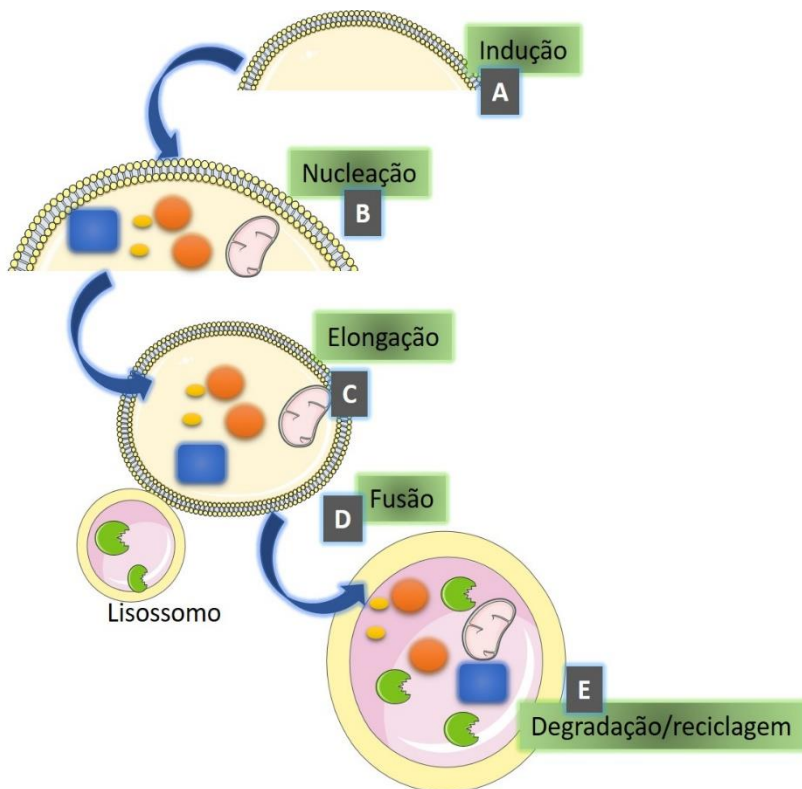
mecanismo neurotóxico dos glicocorticóides não somente envolve a ativação de apoptose, uma vez que outros tipos de morte celular podem ser desencadeados por estes hormônios (REAGAN e MCEWEN, 1997).

Nesse sentido, existem relatos na literatura de que os glicocorticóides podem induzir a morte de células em tecidos periféricos (no músculo e em células tumorais) mediante autofagia (GRANDÉR *et al.*, 2009; TRONCOSO *et al.*, 2014). Além disso, a corticosterona também pode induzir a citotoxicidade mediante o mecanismo de autofagia em tecidos neurais. Por exemplo, um estudo demonstrou que o modelo de ECI é capaz de aumentar a expressão de efetores autofágicos, um efeito que foi associado com a perda de neurônios hipocâmpais em ratos (HOU *et al.*, 2015). Além disso, a deprivação de folato em culturas de células HT22 (derivadas de hipocampo de camundongo) induz a ativação de GR, a expressão de genes relacionados com a autofagia e a neurotoxicidade nestas células (SUN *et al.*, 2016).

Sob condições fisiológicas, a autofagia é um mecanismo celular imprescindível para a sobrevivência de células, uma vez que nestas condições a célula recicla e processa preferencialmente proteínas e organelas disfuncionais ou danificadas (LI *et al.*, 2014). O mecanismo da autofagia envolve a formação de pequenos fagóforos ou complexos lisossomais, os quais se formam resumidamente em 5 passos (Fig. 1.11) (LI *et al.*, 2014). O processo começa com a indução mediada pelos complexos de proteínas Atg (genes ligados a autofagia) (Fig. 1.11A) seguido do recrutamento de proteínas e lipídeos que formarão o autofagossoma na etapa de nucleação vesicular (Fig. 1.11B), o qual envolve a ativação do complexo PI3K/Beclina-1. Na sequência, ocorre a conjugação de proteínas Atg e a cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (Fig. 1.11C), proteínas similares as do sistema de ubiquitina,

as quais medeiam a fusão ou acoplamento e formação do autofagossoma (Fig. 1.11D). Finalmente, o autofagossoma se funde na dupla membrana do lisossomo para formar o autolisossomo, onde ocorre a degradação e reciclagem do material citoplásmico (Fig. 1.11E) (LI *et al.*, 2014).

Figura 1.11: Mecanismo celular de autofagia



O processo de autofagia compreende 5 passos principais: A) Indução, B) nucleação e recrutamento de componentes celulares e proteínas disfuncionais, C) elongação e formação do autofagossoma, D) fusão do autofagossoma com o lisossomo e, E) formação do autolisossomo e degradação ou reciclagem dos componentes. A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Além de ser considerado um processo fisiológico, a autofagia é conhecida como um tipo de morte celular tipo II (LI *et al.*, 2014). Contudo,

apesar de ser independente de caspases, seu mecanismo está bastante relacionado com a necrose e a apoptose, sendo que o excesso de autofagia é induzido em condições patológicas e pode levar à morte celular (LI *et al.*, 2014). Ainda, diversos estudos têm demonstrado que a autofagia está envolvida na neurotoxicidade hipocampal em doenças neurodegenerativas e na isquemia cerebral (LI *et al.*, 2014). Por exemplo, um estudo *in vitro* revelou que o tratamento de neurônios derivados de uma cultura primária hipocampal com peptídeos A β ou com corticosterona foi capaz de promover a agregação de proteínas sinápticas, a disfunção neuronal e a morte por apoptose (WUWONGSE *et al.*, 2013). Este processo foi mediado em parte pelo aumento da expressão de proteínas da cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (WUWONGSE *et al.*, 2013). Neste mesmo trabalho, os autores demonstram que o tratamento com antidepressivos foi capaz de prevenir estes efeitos neurotóxicos e de reduzir a autofagia induzida pela corticosterona (WUWONGSE *et al.*, 2013). Estes dados sugerem que a neurotoxicidade induzida pela corticosterona em situações de estresse e relacionados com o desenvolvimento do TDM podem envolver em parte, processos de morte celular mediados por autofagia.

Com base no exposto até o momento, nota-se que o TDM é um transtorno multifacetado, com diversos mecanismos fisiopatológicos envolvidos. Ainda, diversos outros fatores podem estar envolvidos na fisiopatologia do TDM, incluindo alteração da plasticidade sináptica, neurogênese, processos inflamatórios, estresse nitrosativo, disfunção monoaminérgica e glutamatérgica, os quais estão fora do objetivo desta tese.

Na tentativa de melhor entender sobre esse transtorno de humor, bem como descobrir estratégias para melhorar o tratamento, modelos experimentais de depressão *in vivo e in vitro* são de grande valia.

1.3.6 Modelos *in vivo* para o estudo de efeitos e mecanismos de compostos com ação tipo-antidepressiva

O estudo do potencial antidepressivo de compostos pode ser investigado utilizando testes preditivos de atividade antidepressiva como o TSC. Quando expostos a este teste, os animais expressam um aumento do tempo de imobilidade, uma resposta que é considerada de desespero comportamental relacionado com um comportamento tipo-depressivo. Além disso, são utilizados modelos experimentais nos quais os animais são expostos a situações de distresse, como o ECI. O fenótipo tipo-depressivo em animais também pode ser induzido farmacologicamente pelo tratamento crônico com corticosterona. A utilização destes modelos permite investigar também possíveis mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo de compostos (KRISHNAN e NESTLER, 2011).

1.3.7 Modelos *in vitro* de neurotoxicidade e investigação do mecanismo intracelular dos antidepressivos

Cultivos celulares são utilizados principalmente para conhecer os efeitos específicos de um composto em um determinado tipo celular (JANTAS, 2016). Ainda, com estes modelos é possível verificar os achados de modelos *in vivo* e conhecer novos alvos do mecanismo intracelular de um determinado composto com ação antidepressiva (JANTAS, 2016). Considerando que o hipocampo é uma das principais estruturas encefálicas reguladoras do humor e constitui uma das regiões

mais afetadas pelos hormônios associados ao estresse, pois contém uma alta densidade de GR, é necessário investigar modelos celulares derivados de culturas hipocampais.

A linhagem HT22 deriva de células clonais hipocampais de camundongo que foram imortalizadas utilizando o antígeno SV-40T sensível à temperatura (MORIMOTO e KOSHLAND, 1990) e são extremamente fáceis de utilizar e manipular. Estas células são especialmente vulneráveis a danos com glicocorticóides como a dexametasona e corticosterona. A primeira evidência de que glicocorticóides são diretamente tóxicos em células hipocampais surgiu há aproximadamente 30 anos, quando foi demonstrado que a incubação de células HT22 com corticosterona aumenta a suscetibilidade destas aos efeitos tóxicos de insultos metabólicos, sendo este efeito bloqueado por RU486, antagonista de GR (SAPOLSKY *et al.*, 1988), o que evidencia que estas células expressam GR (BEHL *et al.*, 1997). Estes dados indicam ainda que as HT22 podem ser consideradas de células tipo-neurônios imaturos (ou neuroblastos) (EGELAND *et al.*, 2015). Diversos autores confirmaram que as células HT22 são sensíveis ao estímulo com glicocorticóides, o que faz destas um excelente modelo para estudar a indução da morte celular por glicocorticóides (BEHL *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2015). Além disso, as células HT22 são úteis para investigar mecanismos de regulação mediados pela expressão de genes ativados por GR frente a diversos fatores (JANTAS, 2016) assim como a relação entre a sinalização mediada pela ativação de GR e mecanismos do TDM (JANTAS, 2016).

Estas células também expressam marcadores colinérgicos (transportador de colina, transportador vesicular de acetilcolina e

receptores muscarínicos de acetilcolina), pelo qual podem ser uma ferramenta no estudo de mecanismos relacionados com o TDM e a DA (JANTAS, 2016).

Apesar de aparentemente não expressar receptores ionotrópicos glutamatérgicos, esta linhagem é uma das mais sensíveis a elevadas concentrações de glutamato (MAHER e DAVIS, 1996). Por esta razão, as células HT22 são utilizadas como modelo de excitotoxicidade oxidativa induzida pela depleção de glutatona e de cisteína (MAHER e DAVIS, 1996; LIU *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2013). Esta linhagem expressa receptores de dopamina (ISHIGE *et al.*, 2001; LUEDTKE *et al.*, 2012), e enzimas que metabolizam monoaminas como MAO-A e MAO-B (MAHER e DAVIS, 1996).

Finalmente, vários estudos têm investigado o potencial neuroprotetor de compostos com ação antidepressiva frente a diversos insultos e mecanismos neurotóxicos utilizando as células HT22 (BEHL *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando as evidências expostas até o momento, pode ser destacado que o TDM é um dos transtornos psiquiátricos mais prevalentes no mundo, de fisiopatologia heterogênea e complexa. Além disso, as terapias com fármacos de ação antidepressiva disponíveis atualmente apresentam uma baixa eficiência na clínica, podem causar diversos efeitos colaterais e levam à redução da adesão do paciente ao tratamento. Portanto, são necessários a busca e o estudo de novos alvos e estratégias farmacológicas para a prevenção e tratamento do TDM. Considerando os diversos efeitos biológicos, o potencial neuroprotetor e o perfil farmacológico seguro do AU, podemos inferir que este composto constitui um putativo composto antidepressivo com promissória aplicação para o tratamento do TDM.

Até o momento sabe-se que os efeitos tipo-antidepressivos do AU envolvem a atividade monoaminérgica e ativação de receptores dopaminérgicos, entretanto até o momento não se conhecem os alvos e os mecanismos intracelulares mediado por este efeito.

A presente tese foi dividida em 3 capítulos. O objetivo principal do primeiro e segundo capítulo desta tese corresponde ao estudo do mecanismo intracelular do efeito tipo-antidepressivo. Ainda, estudos prévios constataram um possível efeito neuroprotetor do AU frente a diversos insultos no SNC, sendo que até o momento não se sabe o seu efeito nem se conhecem os mecanismos intracelulares do AU frente a um insulto neurotóxico com corticosterona como modelo *in vitro* de distresse. Este constitui o principal objetivo do terceiro capítulo deste trabalho. Parte do último capítulo foi realizado sob supervisão da Profa. Dra. Manuela G. López no Laboratório 4 do Instituto Teófilo Hernando,

Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina,
Universidad Autónoma de Madrid/UAM (Madrid, España).

3. HIPÓTESE

Tanto o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC em camundongos como seu efeito neuroprotetor em células HT22 envolvem a ativação de vias de sinalização dependentes de PKA, PKC, MEK/ERK, CaMKII, PI3K e da enzima HO-1, bem como a inibição de apoptose e autofagia induzida pela corticosterona.

4. OBJETIVO GERAL

- Investigar os mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo e neuroprotetor do AU.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as vias de sinalização celular implicadas no efeito tipo-antidepressivo do AU. (Desenvolvido no Capítulo I)
- Investigar a participação de HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do AU. (Desenvolvido no Capítulo II)
- Investigar o potencial neuroprotetor do AU e seus mecanismos celulares e moleculares envolvidos frente ao estresse celular induzido pela corticosterona. (Desenvolvido no Capítulo III)

5. Capítulo I: VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR IMPLICADAS NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS

Considerando que os compostos antidepressivos disponíveis atualmente podem modular diferentes vias de sinalização intracelular por meio da ativação de proteínas cinases (POPOLI *et al.*, 2000) e que o AU exerce efeito tipo-antidepressivo no TSC, cujo efeito depende dos sistemas dopaminérgico (MACHADO *et al.*, 2012), serotoninérgico e noradrenérgico (COLLA *et al.*, 2014); nesta primeira etapa o objetivo geral foi investigar as vias de sinalização intracelulares envolvidas no efeito tipo-antidepressivo do AU em camundongos.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a influência da inibição farmacológica das vias de sinalização intracelulares mediadas por PKA, PKC, CaMKII, MEK/ERK1/2, PI3K/Akt no efeito tipo-antidepressivo do AU.
- Investigar o efeito do AU sobre o nível de fosforilação de DARPP-32 (Thr⁷⁵) no hipocampo de camundongos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos *Swiss* (35±10 g, n = 8-10, 2-3 meses de idade), aleatoriamente distribuídos entre os grupos e mantidos em condições padrão de biotério (20-22 °C e aproximadamente 70% de umidade), com livre acesso à água e comida, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas (luzes acessas às 07:00hs). Os animais foram divididos em grupos de até 14 animais por caixa (gaiolas de

prolpropileno com as seguintes dimensões 41x34x16 cm e cobertas com piso coberto de serragem). Os animais foram aclimatados na sala de experimentação 24h antes dos testes comportamentais e os experimentos foram realizados no ciclo claro entre as 11 e 17h. Os experimentos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo CEUA 00795, em anexo a esta Tese) e todos os esforços foram tomados para manter o bem-estar dos animais e diminuir o número de animais utilizados.

5.2.2 Agentes farmacológicos

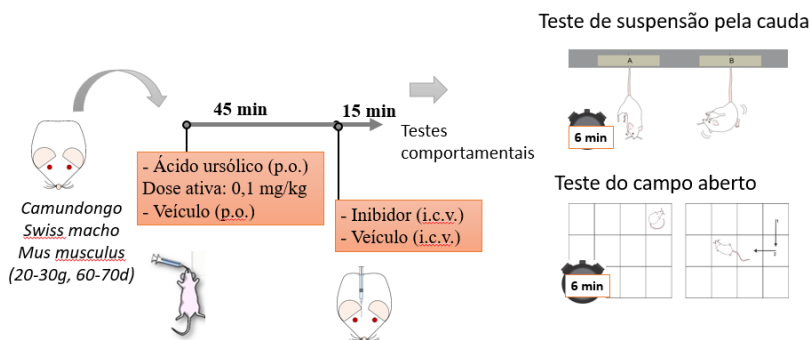
Foram utilizados: AU, queleritrina, H-89, PD98059, U0126, KN-62, wortmanina, LY294002 e, dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, USA). O AU foi dissolvido em água destilada com 10% de Tween 80 e 1% de DMSO. Os inibidores farmacológicos foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9%) e 1% de DMSO.

5.2.3 Desenho experimental

Para verificar quais proteínas cinases estão envolvidas no efeito tipo-antidepressivo do AU, os camundongos receberam via gavagem (p.o.) uma dose ativa de AU (0,1 mg/kg, p.o.) ou do veículo (água destilada contendo 10% de Tween 80 e 1% de DMSO) 60 min antes do TSC para permitir que a droga exerça seu efeito (Fig. 5.1). Quarenta e cinco minutos depois de administrado o AU ou veículo, os animais receberam o veículo (solução salina contendo 1% de DMSO) ou inibidores de cinases: H-89 (inibidor de PKA, 1 µg/sítio, i.c.v.), KN-62 (inibidor de CaMKII, 1 µg/sítio, i.c.v.), queleritrina (inibidor de PKC, 1 µg/sítio, i.c.v.), U0126 (inibidor de MEK1/2, 5 µg/sítio, i.c.v.), PD98059 (inibidor de MEK1/2, 5

$\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.), wortmanina (inibidor irreversível de PI3K, 0,1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) ou LY294002 (inibidor de PI3K, 10 nmol/sítio, i.c.v.) (Fig. 1.1). Todos os inibidores e seus veículos correspondentes foram administrados via i.c.v. em um volume final de 5 μl por sítio. Quinze minutos após a administração dos inibidores foram realizados os testes comportamentais (Fig. 5.1). Os inibidores foram administrados em um volume constante de 10 mg/kg de peso corporal. Tanto as vias de administração quanto as doses utilizadas neste estudo, incluindo a dose ativa do AU, foram baseadas em estudos prévios do nosso laboratório e da literatura que confirmam a eficácia dos protocolos acima descritos e nenhuma das doses causa uma alteração locomotora no TCA (MACHADO *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2014; MANOSSO *et al.*, 2015).

Figura 5.1: Protocolo experimental para a investigação do papel de proteínas cinase no efeito tipo-antidepressivo do AU no teste de suspensão pela cauda (TSC) em camundongos



Camundongos Swiss macho receberam uma dose oral de AU (0,1 mg/kg) ou veículo e, 45 minutos depois receberam por via i.c.v. o inibidor farmacológico ou veículo. Decorridos 15 min, os animais foram submetidos a testes comportamentais: Teste de suspensão pela cauda e o Teste do campo aberto, os quais foram avaliados durante 6 min. *Abreviaturas: dia, d; intracerebroventricular, i.c.v.; grama, g; per os, p.o.* A figura foi produzida pelo autor.

5.2.4 Injeções i.c.v.

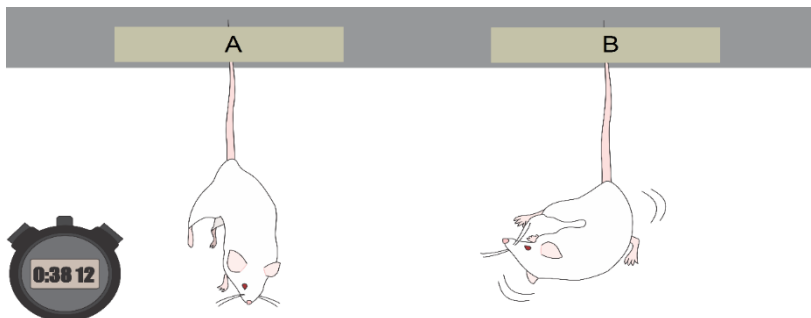
As injeções i.c.v. foram realizadas utilizando uma microseringa Hamilton 25 µl conectada a uma agulha de calibre 26. Previamente à injeção, os animais foram levemente anestesiados com éter (apenas o necessário para a perda do reflexo postural) e em seguida, o uma assepsia no local da injeção foi realizada com 70% etanol. A agulha foi inserida unilateralmente 1 mm para dentro do ponto equidistante de cada olho da linha média e perpendicular ao plano do crânio conforme trabalhos prévios (LAURSEN e BELKNAP, 1986; MAURICE *et al.*, 1996; CUNHA *et al.*, 2016). Um volume de 5 µl de salina estéril (veículo) ou droga (dissolvida em solução salina estéril) foi injetado diretamente no ventrículo lateral esquerdo de cada camundongo. Os resultados de camundongos que receberam uma injeção no local errado ou apresentaram sinais de hemorragia cerebral foram excluídos da análise (menos de 5%). Este tipo de protocolo já foi validado previamente em diversos estudos (BUDNI *et al.*, 2012; MORETTI *et al.*, 2014; MANOSSO *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2016; MANOSSO *et al.*, 2017). Ainda, é importante destacar que utilizando o mesmo protocolo, um estudo prévio verificou que uma solução de isociocianato de fluoresceína conjugado com a lectina ConBr injetado via i.c.v. se distribui através do ventrículo lateral e se concentra mais caudalmente no hipocampo dos camundongos (BARAUNA *et al.*, 2006).

5.2.5 Teste de Suspensão pela Cauda (TSC)

Os camundongos foram suspensos pela cauda 50 cm acima do chão por uma fita adesiva presa cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda (Fig. 5.2). A duração total da imobilidade (ausência de movimento ou movimentos pendulares) foi registrada durante um período de 6 minutos, sendo uma diminuição do tempo de imobilidade considerada um efeito

tipo-antidepressivo (STERU *et al.*, 1985). Todas as contagens de tempo foram realizadas manualmente por um observador cego ao tratamento.

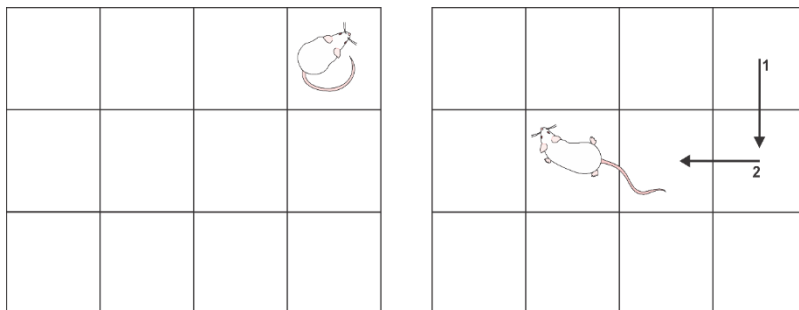
Figura 5.2: TSC



Esquema representativo do fenótipo comportamental de um camundongo submetido ao TSC. Na posição A o animal é considerado imóvel, na situação B o animal está realizando um movimento completo do corpo. A duração total de imobilidade é contabilizada durante 6 min por um observador cego ao tratamento. Autor: André Colla.

5.2.6 Teste do Campo Aberto (TCA)

Para descartar a possibilidade de que uma alteração no tempo de imobilidade dos camundongos no TSC possa ter sido causada devido a uma alteração na atividade locomotora dos animais, os camundongos foram analisados no TCA. Foi utilizada uma caixa de madeira (40×60×50 cm) de cor branca, com 12 quadrantes iguais representados no piso (Fig. 5.3). O número de cruzamentos dos quadrantes realizados pelos camundongos foi contado por um período de 6 minutos. O piso do aparato foi limpo com uma solução de etanol 10% entre os testes (RODRIGUES *et al.*, 1996). Todas as contagens foram realizadas manualmente por um observador cego ao tratamento.

Figura 5.3: Teste de campo aberto

Esquema da atividade locomotora de um animal submetido ao TCA. Durante 6 min um observador cego ao tratamento contabiliza a quantidade de quadrantes que o animal realiza, a qual é expressa como número de cruzamentos. Autor: André Colla.

5.2.7 Análise do imunoconteúdo das proteínas por Western Blot

Para avaliar a fosforilação de DARPP-32 (forma fosforilada do resíduo Thr⁷⁵ e forma total), os camundongos receberam uma dose ativa de AU (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo 60 min antes da eutanásia. Os animais foram mortos rapidamente por decapitação e, a continuação, o encéfalo de cada animal foi removido e os hipocampi (estruturas direita e esquerda) foram dissecados sobre uma placa de Petri invertida sobre gelo, e coberta com um papel filtro embebido em solução salina. Finalizada a obtenção da estrutura, cada amostra foi imersa imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C até a sua análise.

Posteriormente, as estruturas foram mecanicamente homogeneizadas utilizando um tampão contendo 50 mM TRIS pH 7.0, 1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 100 mM de fluoreto de sódio, 0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 2 mM Na_3VO_4 , 1% Triton X-100, 10% glicerol, e um coquetel de inibidor de proteases (Amresco, código M222) (MANOSSO *et al.*, 2015). As amostras obtidas foram

levadas a centrifugação (10.000 g por 10 min a 4°C), o sobrenadante foi diluído em *Stop solution* dodecil sulfato de sódio ou SDS 8% (contendo 10% SDS, 100 mM EDTA, 500 mM TRIS) e o conteúdo proteico foi quantificado utilizando uma curva de albumina sérica bovina como estândar e seguindo o protocolo de Peterson (PETERSON, 1977). A eletroforese foi realizada em minigel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) onde foram aplicados uniformemente 60 µg de proteína e as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando um aparato de transferência semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5 h) (MANOSSO *et al.*, 2015). Para verificar a eficiência da transferência, as membranas foram incubadas com solução de Ponceau e, a continuação foram lavadas com água miliQ e bloqueiadas com 2% albumina sérica bovina (diluído em solução salina-tris tamponada ou TBS) durante 60 min a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos (ver Tabela 2) primários (diluídos em TBS + 0,1% Tween 20 ou TBS-T junto com 2% albumina): anti-fosfo DARPP-32 Thr⁷⁵ (rabbit, 32 kDa, Novus Biologicals, 1:5.000), anti-total DARPP-32 (rabbit, 32 kDa, Abcam, 1:20.000) e anti- β-actina (mouse, 43 kDa, Santa Cruz, 1:2000) *overnight* e logo após com os anticorpos secundários correspondentes (também diluídos em TBS-T+ 2% albumina) durante 60 min (ver Tabela 2). A imunorreação das bandas foi realizada utilizando um kit de quimioluminescência (ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent, código RPN2235, GE Healthcare, Sigma, Brasil) e as imagens foram capturadas utilizando o protocolo “Blot” e a opção “Chemi Hi resolution” do software ImageLab ©Bio-Rad em um fotodocumentador ChemiDoc MP® BioRad® do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do CCB/UFSC. Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos de repetidas lavagens (3 vezes de 5 min) com TBS-T. A

densidade das bandas foi avaliada por densitometria ótica (DO) no programa ImageLab versão 5.2.1 (©Bio-Rad *laboratories*). O nível de fosforilação de DARPP-32 foi determinado como a razão da DO entre fosfo-DARPP-32 Thr⁷⁵ e total-DARPP-32, e a fosforilação total de fosfo-DARPP-32 Thr⁷⁵ e total-DARPP-32 foram determinados como a razão da DO entre fosfo-DARPP-32 Thr⁷⁵ ou total-DARPP-32 e β -actina, respectivamente.

5.2.8 Análise estatística

A comparação entre os grupos experimentais e controles foi analisada por análise de variância (ANOVA) de duas vias e quando apropriado, as análises foram seguidas do teste *posthoc* Newman-Keuls. A análise da fosforilação no sítio 75 de DARPP-32 foi realizada pelo teste *t* de *Student* unilateral. Foram considerados valores de $p < 0,05$ estatisticamente significantes e os resultados em todos os experimentos foram expressos com média + erro padrão da média (E.P.M.). Os valores foram analisados utilizando o programa StatSoft v. 7 e os gráficos foram realizados com o software GraphPad Prism v. 6.0.

5.3 RESULTADOS

Em todos os grupos experimentais o AU exerceu um efeito tipo-antidepressivo ($p < 0,05$) nos camundongos no TSC (n do controle = 10, n dos grupos AU, H-89 e AU vs H-89 = 8). O tratamento dos animais com H-89 (1 μ g/sítio, i.c.v., inibidor da PKA) preveniu este efeito do AU (Fig. 5.4B). A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo e as análises *posthoc* revelaram diferenças no tratamento com AU ($F_{[1,30]} =$

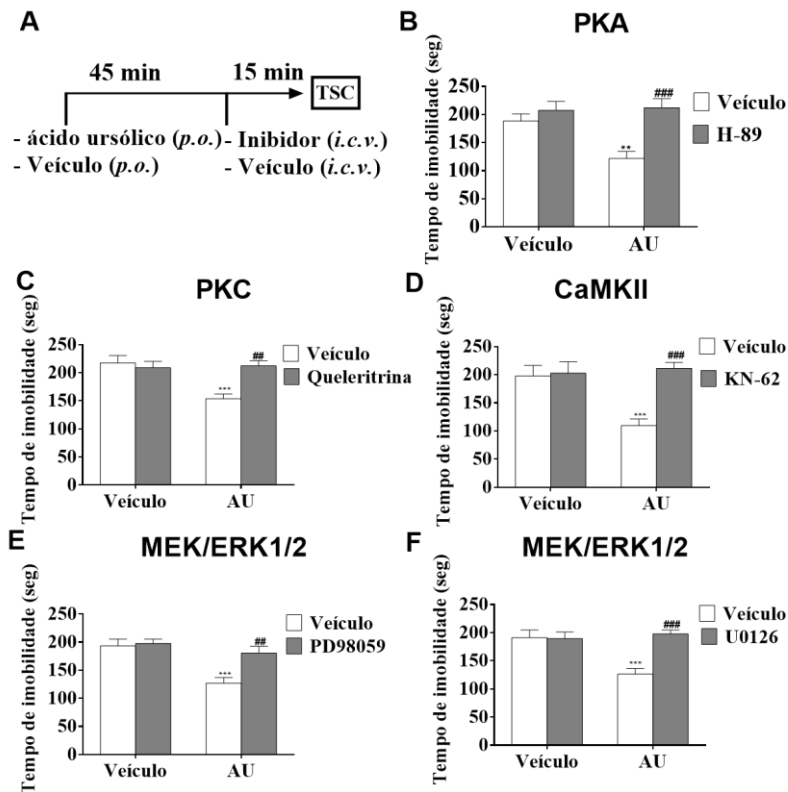
4,70; $p < 0,05$), H-89 ($F_{[1,30]} = 14,50$; $p < 0,001$) e na interação AU x H-89 ($F_{[1,30]} = 6,20$; $p < 0,05$).

O tratamento dos camundongos com queleritrina (1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v., inibidor de PKC) 15 min antes do TSC aboliu a redução do tempo de imobilidade induzida pelo AU (Fig. 5.4C) (n do controle = 8, n dos grupos AU, queleritrina e AU vs queleritrina = 9). A análise estatística ANOVA seguida do *posthoc* Newman Keuls revelou uma diferença no tratamento com AU ($F_{[1,31]} = 8,27$; $p < 0,01$), queleritrina ($F_{[1,31]} = 5,67$; $p < 0,05$) e na interação AU x queleritrina ($F_{[1,31]} = 10,34$; $p < 0,01$).

A Figura 5.4D mostra que a diminuição do tempo de imobilidade induzida pelo AU no TSC ($p < 0,001$) foi abolida pela administração do inibidor de CaMKII, KN-62 (1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) (n de de cada grupo = 8). A ANOVA de duas vias seguido da análise *posthoc* demonstrou diferenças no tratamento com AU ($F_{[1,28]} = 6,25$; $p < 0,05$), KN-62 ($F_{[1,28]} = 11,31$; $p < 0,01$) e na interação AU x KN-62 ($F_{[1,28]} = 9,20$; $p < 0,01$).

Adicionalmente, observamos que a administração de dois inibidores de MEK/ERK1/2 (PD98059 e U0126, ambos 5 $\mu\text{g/sítio}$, via i.c.v.) reverteu o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC (Figuras 5.4E-F). A ANOVA de duas vias demonstrou um efeito do AU ($F_{[1,31]} = 15,69$; $p < 0,001$) e da interação AU x PD98059 ($F_{[1,31]} = 7,54$; $p < 0,01$) e do tratamento com PD98059 ($F_{[1,31]} = 5,36$; $p < 0,05$) (n do controle, PD98059 e AU = 9, n de AU vs H-89 = 8). No experimento com U0126, a ANOVA revelou um efeito do tratamento com AU ($F_{[1,29]} = 6,90$; $p < 0,05$), U0126 ($F_{[1,29]} = 10,53$; $p < 0,01$) e AU x U0126 ($F_{[1,29]} = 11,64$; $p < 0,01$) (n do controle, PD98059 e AU = 8, n de AU vs H-89 = 9).

Figura 5.4: Efeito do tratamento com inibidores de cinases no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC

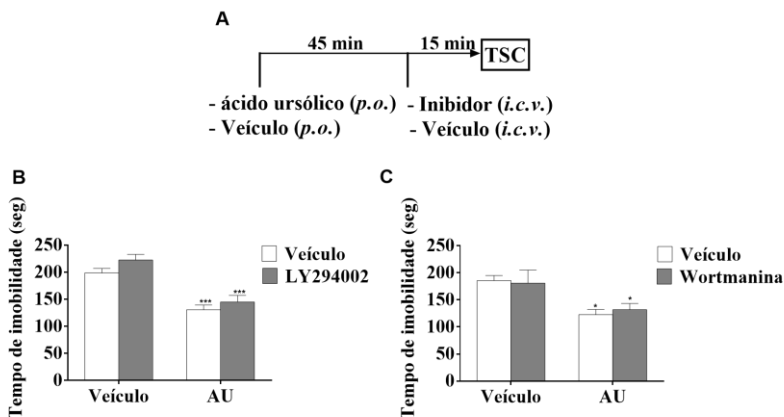


Protocolo experimental (A). Efeito da administração de uma dose efetiva de AU (0,1 mg/kg, *p.o.*) ou veículo seguido da administração de: H-89 (inibidor de PKA, 1 µg/sítio, *i.c.v.*) (B), quelerritrina (inibidor de PKC, 1 µg/sítio, *i.c.v.*) (C), KN-62 (inibidor de CaMKII, 1 µg/sítio, *i.c.v.*) (D), PD98059 (5 µg/sítio, *i.c.v.*) (E) e U0126 (5 µg/sítio, *i.c.v.*) (F), ambos inibidores de MEK/ERK1/2 no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. Os valores estão expressos como média + E.P.M. ($n = 8-10$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com veículo, ### $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado com AU (Teste ANOVA de 2 vias seguida pelo *posthoc* de Newman-Keuls).

Em outro grupo de experimentos foi investigada a participação de PI3K no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. A administração de

LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v.) ou de wortmanina (0,1 μ g/sítio, i.c.v.) não alterou os efeitos do AU no TSC ($p>0,05$) (Fig. 5.5B-C).

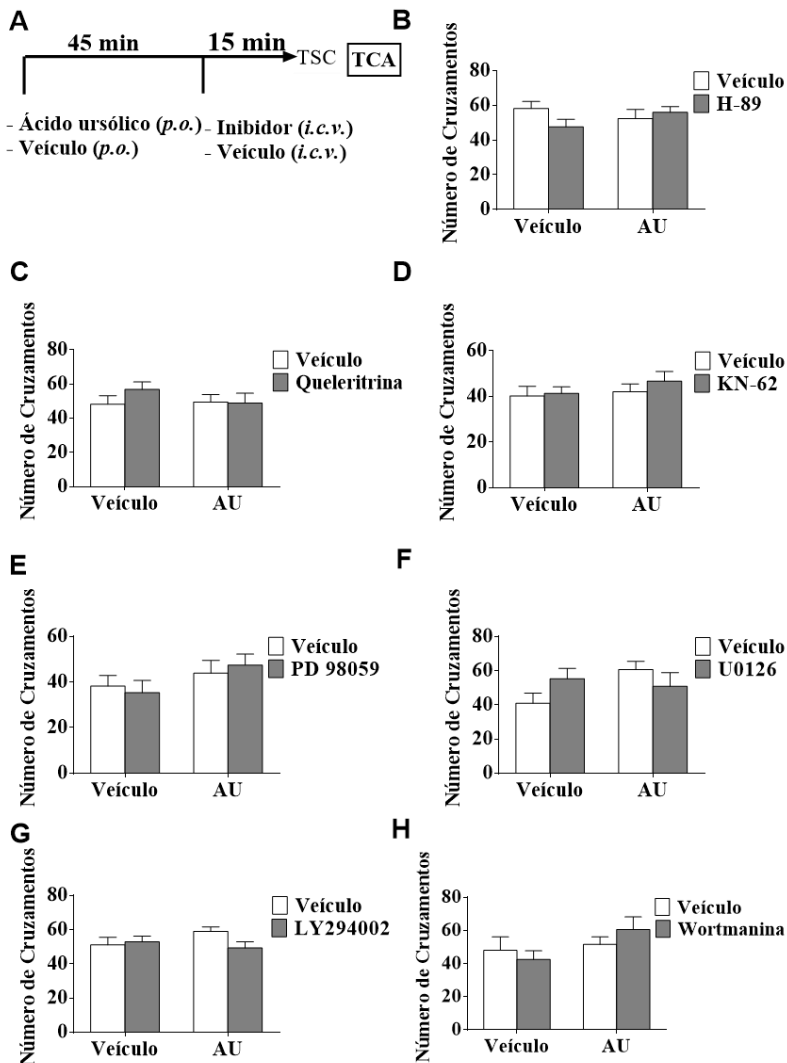
Figura 5.5: Efeito do tratamento com inibidores de PI3K no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC



Protocolo experimental (A). Efeito da administração de uma dose efetiva de AU (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo seguido da administração de: LY294002 (inibidor de PI3K, 10 nmol/sítio, i.c.v.) (B) ou wortmanina (inibidor de PI3K, 0,1 μ g/sítio, i.c.v.) (C) no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 8-10). * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ quando comparado com veículo (Teste ANOVA de duas vias seguida pelo *posthoc* de Newman-Keuls).

Para descartar a possibilidade de que uma alteração no tempo de imobilidade dos camundongos no TSC possa ter sido causada devido a uma alteração na atividade locomotora dos animais, os camundongos foram analisados no TCA. A análise estatística revelou que nenhum tratamento farmacológico afetou o número de cruzamentos no TCA ($p>0,05$) (Fig. 5.6).

Figura 5.6: Efeito do tratamento com inibidores de cinases no comportamento locomotor de camundongos tratados com AU no TCA

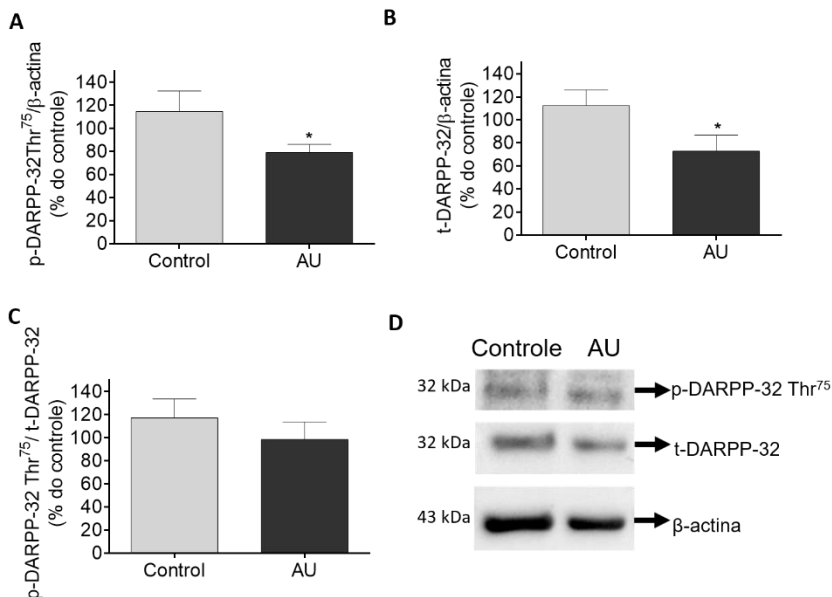


Protocolo experimental (A). Efeito da administração de dose efetiva de AU (0,1 mg/kg, *p.o.*) ou veículo seguido da administração de: H-89 (inibidor de PKA, 1 μ g/sítio, *i.c.v.*) (B), quelitrina (inibidor de PKC, 1 μ g/sítio, *i.c.v.*) (C), KN-62 (inibidor de CaMKII, 1 μ g/sítio, *i.c.v.*) (D), PD98059 (5 μ g/sítio, *i.c.v.*) (E) e U0126 (5 μ g/sítio, *i.c.v.*) (F), ambos inibidores de MEK/ERK1/2; LY294002 (G),

ou wortmanina (inibidores de PI3K, 10 nmol/sítio e 0,1 µg/sítio, i.c.v.) (H) na alteração da atividade locomotora no TCA. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 8-10). (Teste ANOVA de duas vias).

Na segunda etapa do trabalho foram investigados os níveis de fosforilação de DARPP-32 Thr⁷⁵ em homogenatos de hipocampo obtidos de camundongos tratados com uma dose ativa de AU (0,1 mg/kg) 60 min. A análise semi-quantitativa por DO revelou que os níveis de fosforilação no sítio 75 de DARPP-32 no hipocampo dos camundongos tratados durante 60 min com AU teve redução de aproximadamente 20 a 30% nos níveis de p-DARPP-32 Thr⁷⁵ (Fig. 5.7A) e do imunoconteúdo total de DARPP-32 (Fig. 5.7B), respectivamente nos hipocampos em relação ao controle ($t_{(8)} = 1,86$; $p < 0,05$ e $t_{(8)} = 2,02$; $p < 0,05$, respectivamente). Contudo, a razão p-DARPP-32 Thr⁷⁵/t-DARPP-32 foi similar tanto nos animais controle quanto nos animais que receberam AU durante 60 min ($p > 0,05$) (Fig. 5.7C).

Figura 5.7: Efeito da administração de AU (0,1 mg/kg, p.o.) durante 60 min nos níveis de p-DARPP-32 Thr⁷⁵, t-DARPP-32 e nos níveis de fosforilação de DARPP-32 Thr⁷⁵ no hipocampo de camundongos



Fosfo-DARPP-32 Thr⁷⁵ foi determinada pela relação da DO da forma fosforilada de DARPP-32 e da DO da banda de β-actina (A). Os níveis totais de DARPP-32 foram quantificados pela razão da DO de DARPP-32 total e a DO de β-actina (B). Em camundongos tratados com AU, a razão entre a forma fosforilada e total de DARPP-32 foi similar ao grupo controle (C). O painel D mostra membranas representativas de blot da imunoreatividade de amostras hipocampais para p-DARPP-32 Thr⁷⁵, t-DARPP-32 e β-actina (D). Os resultados estão expressos como porcentagem do controle (média + E.P.M. de 5 amostras). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (Teste t de *Student*, unilateral).

5.4 DISCUSSÃO

Uma das hipóteses mais modernas da etiologia neurobiológica do TDM propõe a existência de uma possível relação entre o mecanismo de ação dos compostos antidepressivos e uma modulação de vias de sinalização intracelulares relacionadas com a neuroplasticidade e a sobrevivência de neurônios, cujo processo mediará os efeitos tardios e

adaptativos dos fármacos antidepressivos na remissão de sintomas (POPOLI *et al.*, 2000; NICIU *et al.*, 2013). Diversos componentes participam de vias de transdução de sinais, assim destacamos: receptores acoplados a proteína G, proteínas cinases e fosfatases e fatores de transcrição. Especificamente, um grande número de evidências tem implicado as vias de sinalização intracelular mediadas por PKC, PKA, CaMKII, MEK/ERK1/2 e PI3K na fisiopatologia do TDM e nos mecanismos envolvidos nos efeitos dos antidepressivos (POPOLI *et al.*, 2000). Nosso grupo de pesquisa tem estudado diversos compostos com ação tipo-antidepressiva e, recentemente foram descritos efeitos promissores do AU, um composto triterpeno, que exerce efeitos tipo-antidepressivos em diversos modelos preditivos e em modelos de depressão em camundongos, como o ECI e administração crônica de corticosterona. Trabalhos prévios do nosso grupo já demonstraram que os sistemas de neurotransmissão serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica contribuem com o efeito tipo-antidepressivo do AU (Fig. 5.8) (MACHADO *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014), entretanto até o momento não tinham sido avaliadas o papel de vias intracelulares envolvidas neste efeito. Neste estudo, uma atenção especial foi dada as proteínas cinases relacionadas com vias de sinalização intracelular envolvidas no controle da neuroplasticidade e na sobrevivência neuronal e demonstramos pela primeira vez a contribuição de proteínas cinases, relacionadas com o sistema monoaminérgico, PKA, PKC, MEK/ERK 1/2 e CaMKII no efeito anti-imobilidade do AU no TSC.

Diversos autores têm demonstrado que a desregulação da atividade e uma expressão reduzida de PKA está diretamente relacionada com o desenvolvimento de sintomas depressivos (DWIVEDI e PANDEY, 2008), sendo que evidências neste sentido foram encontradas no córtex

pré-frontal (área 10 de Brodmann) *post-mortem* de vítimas de suicídio (SHELTON *et al.*, 2009). De fato, existem trabalhos que mostraram que o H-89, um inibidor competitivo do sítio de ligação ao ATP na subunidade catalítica de PKA (MURRAY, 2008), bloqueia os efeitos tipo-antidepressivos observados nos camundongos tratados com fluoxetina ou submetidos à acupuntura, duas abordagens clínicas utilizadas no tratamento do TDM (LIU *et al.*, 2012). Ainda, Brański e col. (2008) demonstraram que a administração de um ativador da atividade de PKA, 8-Br-AMPC, promoveu efeitos tipo-antidepressivos diminuindo o tempo de imobilidade de camundongos no TSC (BRAŃSKI *et al.*, 2008). Nossos resultados parecem estar de acordo com os descritos previamente, visto que no nosso estudo o tratamento de camundongos com H-89 aboliu completamente o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC (Fig. 5.8). Além disso, H-89 bloqueou o efeito lipolítico do AU em adipócitos de cultura primária (LI *et al.*, 2010) o que sugere que outros efeitos periféricos do AU dependam da atividade de PKA.

Utilizando o inibidor KN-62, composto que atua interagindo com o sítio de ligação de CaMKII à calmodulina (DAVIES *et al.*, 2000), também demonstramos que CaMKII participa dos efeitos do AU no TSC. Existem vários relatos que indicam que a CaMKII é uma enzima que está implicada na fisiopatologia do TDM. Estudos clínicos já demonstraram que existe uma diminuição na expressão de CaMKII α (isoforma α de CaMKII, expressa quase exclusivamente no encéfalo) no córtex pré-frontal tanto de pacientes com TDM quanto de pacientes com transtorno bipolar (XING *et al.*, 2002). Além disso, Shi e col. (2012) reportaram uma relação entre polimorfismos em genes relacionados com a cascata de sinalização mediada por CaMK e a remissão dos sintomas após o tratamento antidepressivo (SHI, *et al.*, 2012). Ainda, estudos pré-clínicos

demonstraram que o tratamento agudo com imipramina ou terapia eletroconvulsiva aumentaram a atividade de CaMKII no hipocampo dos camundongos (PILC *et al.*, 1999). Nossos resultados corroboram com estes e outros estudos prévios (Fig. 5.8), os quais demonstraram que o KN-62 aboliu o efeito tipo-antidepressivo do zinco (MANOSSO *et al.*, 2015), ácido ferúlico (ZENI *et al.*, 2012) e da creatina (CUNHA *et al.*, 2014).

As proteínas cinases estudadas neste trabalho estão envolvidas nos mecanismos intracelulares de neuroplasticidade e de produção de fatores neurotróficos que asseguram a sobrevivência neuronal (POPOLI *et al.*, 2000). Entre eles, a via de sinalização regulada pelo BDNF, a qual constitui uma das cascatas mais estudadas. Esta cascata pode ativar as seguintes proteínas cinases: inositol trifosfato, MAPK e PI3K (NICIU *et al.*, 2013). PKC constitui um dos principais efetores relacionados à cascata de sinalização intracelular dependente de inositol trifosfato. Após sua ativação, a PKC regula a liberação de neurotransmissores e a plasticidade sináptica pela fosforilação de outros substratos, tais como CREB, canais iônicos e outras vias de sinalização (ABRIAL *et al.*, 2011; ABRIAL *et al.*, 2013). Estudos clínicos demonstraram que existe uma diminuição da expressão de PKC no córtex pré-frontal de pacientes depressivos (SHELTON *et al.*, 2009) e uma redução nos sítios de ligação para PKC em tecido cerebral *post-mortem* (áreas 8 e 9 de Brodmann) de vítimas de suicídio (PANDEY *et al.*, 1997). Ainda, estudos pré-clínicos reportaram um papel de PKC na atividade antidepressiva da cetamina (RÉUS *et al.*, 2011) e da terapia eletroconvulsiva (KIM *et al.*, 2010) duas abordagens muito aplicadas para o tratamento da depressão refratária a tratamentos farmacológicos convencionais. Nosso trabalho está de acordo com estes achados visto que a queleritina, um alcaloide bezofenantiridina que atua como inibidor seletivo da PKC (HERBERT *et al.*, 1990), reverteu a

redução no tempo de imobilidade exercido pelo AU no TSC (Fig. 5.8). Estes dados complementam e corroboram outros achados sobre a relação entre a ativação de PKC e efeitos tipo-antidepressivo do AU no TSC, assim como foi previamente observado em relação a compostos com potencial antidepressivo como o zinco e a creatina (CUNHA *et al.*, 2014; MANOSSO *et al.*, 2015). De acordo com nossos achados, a incubação de células adiposas 3T3-L1 com AU estimulou a captação de glicose em um mecanismo dependente da fosforilação e ativação de PKC, uma evidência que sugere que esta proteína cinase participa nos efeitos periféricos do AU (HE *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm identificado a via de sinalização mediada por MEK/ERK1/2 como um alvo para o tratamento do TDM. Estudos clínicos demonstraram uma expressão e ativação reduzida de ERK1/2 no córtex pré-frontal *post-mortem* de vítimas de suicídio (DWIVEDI *et al.*, 2001) e uma desregulação de Raf, uma proteína que atua alguns passos antes na cascata de MEK/ERK (Fig. 5.8) (DWIVEDI *et al.*, 2006). Estudos *in vitro* demonstraram que a incubação de astrócitos com fluoxetina promoveu um aumento nos níveis de fosfo-ERK1/2 (MERCIER *et al.*, 2004). De forma similar, estudos pré-clínicos demonstraram que o tratamento de camundongos submetidos a um protocolo de estresse e tratados com imipramina aumentou os níveis de fosfo-ERK1/2 no hipocampo destes animais (LEEM *et al.*, 2014). Além disso, o bloqueio da atividade de MEK, mediante o tratamento com PD184161 (inibidor da fosforilação de ERK1/2), (KLEIN *et al.*, 2006), preveniu o efeito tipo-antidepressivo da desipramina e da sertralina no Teste do Nado Forçado e o efeito de desipramina no TSC em camundongos (DUMAN *et al.*, 2007). No nosso trabalho também observamos um bloqueio do efeito do AU no TSC em camundongos tratados com dois inibidores de MEK/ERK1/2 que

exibem um mecanismo de ação diferente (Fig. 5.8). PD098049 liga-se às enzimas inativas MEK1 e MEK2, prevenindo a sua ativação pela Raf e em consequência inibe a ativação de ERK1/2 (DUDLEY *et al.*, 1995). U0126 inibe diretamente a atividade catalítica da enzima ativa MEK1 e bloqueia então a atividade de MEK1/2 (FAVATA *et al.*, 1998). Esta cascata de sinalização também foi implicada nos efeitos do AU na indução da captação de glicose nos músculos (CASTRO *et al.*, 2015) e na liberação de proteínas inflamatórias em macrófagos (IKEDA *et al.*, 2007).

Um achado muito interessante do nosso trabalho constitui o fato de que os efeitos tipo-antidepressivos do AU parecem não depender da ativação de PI3K. A neurotransmissão mediada pela dopamina e a 5-HT é responsável em parte pela regulação da cascata de transdução de sinais mediada por PI3K/Akt e, em humanos, foi demonstrada uma redução da atividade de PI3K e a Akt1 (isoforma de Akt) no córtex pré-frontal ventral de pacientes depressivos (KAREGE *et al.*, 2011). Estudos pré-clínicos reportam que diversos compostos como o ácido ferúlico (ZENI *et al.*, 2012), ácido fólico (BUDNI *et al.*, 2012), creatina (CUNHA *et al.*, 2016) e fator trefoil 3 (SHI, H. S. *et al.*, 2012) exercem uma ação tipo-antidepressiva por um mecanismo dependente da ativação da via de sinalização celular mediada por PI3K. Entretanto, no nosso trabalho a wortmanina e LY294002 (ambos inibidores de PI3K) não aboliram a atividade tipo-antidepressiva de AU no TSC. Estes resultados sugerem que a sinalização celular mediada por PI3K/Akt parece não estar implicada nos efeitos do AU no TSC. Uma possível explicação pode estar relacionada ao fato de que a via de sinalização intracelular mediada por PI3K pode ser ativada indiretamente via receptores glutamatérgicos (GUILLET *et al.*, 2005) e, como já foi demonstrado previamente, estes receptores parecem não contribuir para os efeitos tipo-antidepressivos do AU no TSC (COLLA

et al., 2014). Contudo, deve-se notar que ainda receptores dopaminérgicos D₂ e D₃ e o receptor 5-HT_{1A} também são capazes de modular a cascata PI3K/Akt (BEAULIEU *et al.*, 2007; BEAULIEU, 2012). Desta forma, são necessários estudos futuros para excluir o envolvimento da via sinalização dependente de PI3K nos efeitos tipo-antidepressivos do AU no TSC. Em contraste com os nossos achados, a capacidade do AU em estimular a captação de glicose nos adipócitos (HE *et al.*, 2014), seus efeitos neuroprotetores (LU *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2013) e a indução da autofagia em células tumorais cervicais TC-1 parecem depender da ativação da cascata dependente de PI3K (LENG *et al.*, 2013).

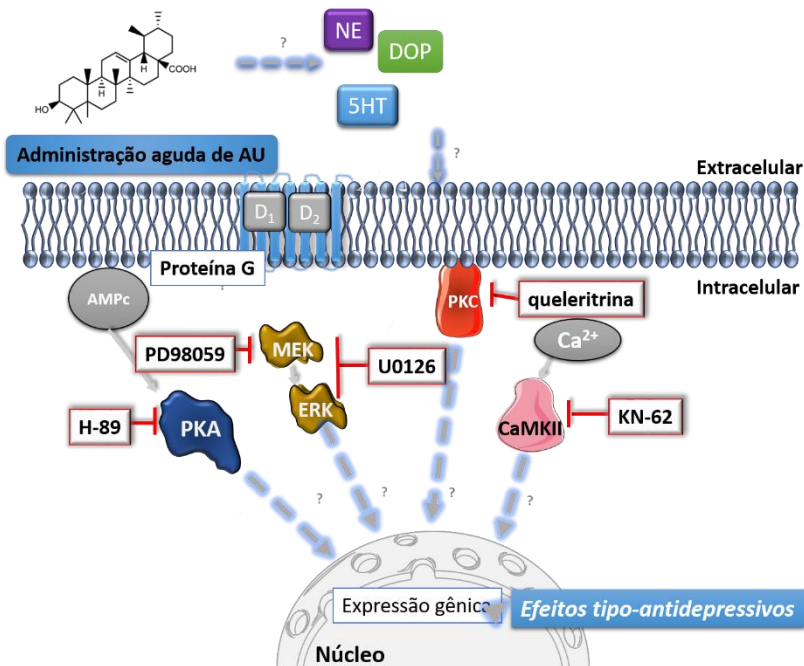
Nosso estudo também investigou o efeito do tratamento com AU nos níveis de DARPP-32 no hipocampo camundongos. Esta fosfo-proteína atua como integradora de vias de sinalização intracelulares contribuindo na regulação da atividade das proteínas cinases e fosfatases (SVENNINGSSON *et al.*, 2004). Especificamente, DARPP-32 é ativada pela via de sinalização dependente de AMPc/PKA (Fig. 1.6) e, em consequência ocorre um aumento na fosforilação do resíduo Thr³⁴ que paralelamente induz a diminuição na fosforilação do resíduo Thr⁷⁵. No entanto, quando a atividade de PKA é inibida, a fosforilação do sítio Thr³⁴ diminui, aumentando a fosforilação no resíduo Thr⁷⁵ (SVENNINGSSON *et al.*, 2004). Estudos em humanos relataram um aumento da expressão de um polimorfismo de t-DARPP-32 (RNAm truncado, sem a região codificante para o NH₂-terminal Thr³⁴ e o domínio inibidor de proteína fosfatase 1, o qual restringe a sinalização dopaminérgica) no córtex pré-frontal *post-mortem* de pacientes com esquizofrenia e depressão bipolar (TORRES *et al.*, 2009; KUNII *et al.*, 2014). Além disso, alguns estudos têm reportado a participação desta proteína nos efeitos tipo-antidepressivos da fluoxetina, imipramina e na terapia eletroconvulsiva

(GUITART e NESTLER, 1992; SVENNINGSSON *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2007). Svenningsson e col. (2002) demonstraram que os efeitos tipo-antidepressivos exercidos pela administração aguda e crônica de fluoxetina são associados a um incremento na fosforilação de Thr³⁴ e uma diminuição concomitante da fosforilação de Thr⁷⁵ no hipocampo dos camundongos (SVENNINGSSON *et al.*, 2002). Nosso trabalho demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo do AU (em 60 min) parece estar associado com níveis reduzidos de DARPP-32 total e de fosfo-DARPP-32 no resíduo Thr⁷⁵ no hipocampo de camundongos. Além disso, nosso trabalho demonstra uma similaridade na taxa de fosforilação do resíduo Thr⁷⁵ no hipocampo de camundongos tratados com AU durante 60 min. Estes dados sugerem que a administração de AU poderia ter afetado especificamente mecanismos pós-traducionais envolvidos na atividade de DARPP-32. Possivelmente, uma redução dos níveis de DARPP-32 tenha reduzido a disponibilidade dos sítios a serem fosforilados, o que foi de fato observado quando comparamos os níveis de fosfo-DARPP-32 Thr⁷⁵ com os níveis de β -actina (controle de carga proteica). Contudo, outros estudos se fazem necessários para melhor averiguar o papel de DARPP-32 no efeito tipo-antidepressivo do AU.

Como conclusão, este capítulo apresenta evidências sobre a contribuição de diversas cinases no efeito tipo-antidepressivo agudo do AU no TSC. Estudos prévios têm demonstrado que os efeitos tipo-antidepressivos do AU dependem em parte da neurotransmissão dopaminérgica (MACHADO *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014), serotoninérgica e noradrenérgica (COLLA *et al.*, 2014). Estes sistemas são componentes chave para a sobrevivência neuronal, a neurogênese e a resposta aos antidepressivos (Fig. 5.8). Além disso, diversos estudos têm demonstrado que as vias de sinalização dependentes de CaMKII, PKA e

PKC, podem modular eventos relacionados com a liberação de neurotransmissores (LEENDERS e SHENG, 2005). A sinalização dependente de MEK/ERK também regula a captação de dopamina assim como a expressão e atividade de receptores de dopamina, sendo que os receptores D₁ e D₂ são capazes de ativar esta cascata de sinalização (YAN *et al.*, 1999; NEVE *et al.*, 2004). Deve ser ressaltado que a ativação da via de sinalização mediada por MEK/ERK pode modular e ativar Akt, o que sugere uma interação entre as diversas cascatas de sinalização intracelulares, sendo que a ativação ou inibição de uma pode modular a atividade de outra (ZHOU *et al.*, 2015). Além disso, os sistemas monoaminérgicos podem ativar a via MEK/ERK (D'SA e DUMAN, 2002). Ainda, receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ podem ativar outras proteínas cinase como PKA, PKC, ERK1/2 e CaMKII (YAN *et al.*, 1999; NEVE *et al.*, 2004). Portanto, estes resultados sugerem que, o possível efeito tipo-antidepressivo do AU está relacionado em parte com a sua atividade sobre os sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos (MACHADO *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014) e a ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular que convergem na expressão ou produção de neurotrofinas. Além disso, é possível que a ativação destas vias promova ao mesmo tempo a ativação dos receptores dopaminérgicos e estimulem a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Este e outros estudos similares reforçam a hipótese de que os processos de neuroplasticidade e os mecanismos de compostos com ação antidepressiva que contribuem significativamente para a melhora dos sintomas do TDM dependem em parte da ativação de proteínas cinases implicadas na sobrevivência e plasticidade neuronal. Portanto, nossos resultados sugerem que o AU constitui uma promissora e potencial estratégia antidepressiva.

Figura 5.8: Vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito tipo-antidepressivo do AU



O efeito tipo-antidepressivo da administração aguda de AU (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC é dependente da disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica e ativação de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂. Subsequentemente, são ativadas diversas vias de sinalização intracelulares, incluindo a dependente de PKA/AMPc, que amplifica o sinal intracelular através da ativação da PKA. Além disso, AU pode ativar a via dependente de MEK/ERK. Outra via que participa do efeito tipo-antidepressivo é a dependente de CaMKII, ativada pelo influxo de Ca²⁺. O AU também pode ativar PKC que se desloca da membrana plasmática para o citosol. Esta hipótese está evidenciada pelo fato de que H-89 (um inibidor de PKA), KN-62 (inibidor de CaMKII), PD98059 e U0126 (inibidores de MEK/ERK 1/2) e queleritrina (inibidor de PKC) aboliram o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. Em conjunto, a ativação destas vias de sinalização pode induzir a expressão gênica relacionada com a melhora do transtorno do humor e mediar os efeitos tipo-antidepressivos do AU no TSC em camundongos. *Abreviaturas: 5-HT, serotonina; ácido ursólico, AU; Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, AMPc; proteína cinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina II, CaMKII; dopamina, DOP; receptores de dopamina tipo 1 e 2, D₁; D₂; proteína cinase regulada por sinal extracelular, ERK; proteína cinase ativada por*

mitógeno, MEK; proteína cinase A, PKA; proteína. A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>)

6. Capítulo II: PAPEL DA HO-1 NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS

O TDM pode ser causado por uma alteração das defesas antioxidantes (RYBKA *et al.*, 2013; PALTA *et al.*, 2014; SPIERS *et al.*, 2014), sendo que a via de sinalização dependente de Nrf2/HO-1 constitui um regulador da resposta antioxidante, da sobrevivência e proteção do SNC (NGUYEN *et al.*, 2009). Quando Nrf2 é ativado este se dissocia de Keap1 e trasloca-se para o núcleo onde promove a transcrição de genes que codificam algumas enzimas antioxidantes, como a HO-1 (ALAM *et al.*, 1999). Algumas evidências experimentais indicaram que vias de sinalização celular mediadas por PKC (ZHANG *et al.*, 2013) e ERK (XU *et al.*, 2006) ativam Nrf2. Além disso, compostos com atividade antioxidante e que atuam modulando a via Nrf2/HO-1 podem constituir estratégias interessantes no tratamento do TDM (ZAFIR *et al.*, 2009; BEHR *et al.*, 2012). Portanto, considerando que o AU exerce efeitos tipo-antidepressivos em camundongos quando submetidos a diversos modelos preditivos de atividade antidepressiva, o qual parece ser mediado em parte pela ativação de PKC e MEK/ERK1/2 (Ver Capítulo I desta Tese) e que o AU possui propriedades antioxidantes (Ver seção 1.2.2 desta Tese). O objetivo geral desta etapa foi investigar a participação de HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do AU em camundongos.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a participação de HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do AU em camundongos.

- Investigar se a administração do AU assim como de um indutor farmacológico de HO-1 promove o aumento do imunoconteúdo de HO-1 no hipocampo dos camundongos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas de aproximadamente 50 dias de idade (*M. musculus*, 40 ± 5 g peso corporal, $n = 7-8$ por grupo experimental), que foram mantidos em caixas de polipropileno brancas com as seguintes dimensões 41x34x16 cm e cobertas com serragem (contendo até 14 animais por caixa) em uma sala de biotério com temperatura e umidade controlada (21 ± 1 °C, e aproximadamente 70% humidade) e exaustão, tendo livre acesso a ração e água. O ciclo claro-escuro era de 12:12 h, tendo o ciclo claro começando às 7:00 h. Os animais foram aclimatados na sala de experimentação 24 h antes do começo dos experimentos comportamentais, sendo que estes foram realizados entre as 11:00 e 17:00 h. Todos os procedimentos foram realizados conforme as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo 00795, Seção 13 desta Tese). Cada animal foi utilizado uma única vez e foram tomados todos os esforços para minimizar e reduzir o sofrimento, garantir o bem-estar animal e reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

6.2.2 Agentes farmacológicos

No presente trabalho foram utilizados: DMSO, AU, protoporfirina de zinco IX (PPZn), protoporfirina de cobalto IX (PPCo)

obtidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, U.S.A.). PPZn e PPCo foram dissolvidos em salina contendo 0,1% DMSO e administrados via i.c.v. em um volume final de 5µl tal como foi descrito na seção 5.2.4 desta Tese. O AU foi dissolvido em 10% Tween 80 contendo 1% DMSO e administrado em um volume constante de 10 ml/kg (p.o.). Os grupos experimentais controle receberam o veículo correspondente.

6.2.3 Desenho experimental

A fim de investigar o papel da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC, um grupo de animais recebeu uma dose efetiva de AU (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo e, 45 min depois, receberam PPZn (10 µg/sítio, i.c.v., um inibidor de HO-1) ou veículo (Fig. 6.1A). Em outro experimento, outros animais receberam doses sub-efetivas de AU (0,01 mg/kg, p.o.) ou veículo e, 45 min depois, os animais foram tratados com uma dose sub-efetiva de PPCo (0,01 µg/sítio, i.c.v.) ou veículo (Fig. 6.2A). Um grupo de animais foi tratado com uma dose efetiva de PPCo (0,1 µg/sítio, i.c.v., um indutor farmacológico de HO-1) ou veículo (Fig. 2.3D-E). Quinze min depois da administração i.c.v. (ou 60 min depois do tratamento via p.o.), os animais foram submetidos ao TSC e TCA (Fig. 6.1A, 6.2A). Todos os protocolos e doses utilizadas no presente estudo foram baseados em estudos prévios que investigaram os efeitos comportamentais do AU (MACHADO *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014) assim como a eficácia dos moduladores farmacológicos na investigação do papel de HO-1 no efeito tipo-antidepressivo de compostos (MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2016; MANOSSO *et al.*, 2017).

6.2.4 Testes comportamentais

Finalizados os tratamentos, os animais foram submetidos ao teste TSC durante 6 min, um teste preditivo de fármacos com atividade

antidepressiva descrito previamente (STERU *et al.*, 1985), cujo procedimento já foi descrito na seção 5.2.5 desta Tese. Aproximadamente 10 min depois de serem submetidos ao TSC, os animais foram submetidos ao TCA durante 6 min com o objetivo de avaliar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a sua atividade locomotora (Ver seção 5.2.6).

6.2.5 Análise do imunoconteúdo de proteínas por Western Blot

Para avaliar o imunoconteúdo de HO-1, os camundongos receberam uma dose ativa de AU (0,1 mg/kg, p.o., n = 4) ou PPCo (0,1 µg/sítio, i.c.v., n = 6) ou veículo. A obtenção das amostras foi realizada imediatamente ao término dos testes comportamentais seguindo a mesma metodologia previamente descrita (Ver seção 5.2.7). Os hipocampus foram mecanicamente homogeneizados e as proteínas foram processadas e quantificadas seguindo o protocolo já descrito na seção 5.2.7. A mesma quantidade de proteínas (60 µg por poço) de cada amostra foi aplicada no mini-gel de SDS-PAGE (10% acrilamida) e transferidos para uma membrana de nitrocelulose utilizando um aparato de transferência semi-dry (Amersham, Biosciences). Para verificar a eficiência da transferência, as membranas foram incubadas com solução de Ponceau e, a continuação foram lavadas com água miliQ e bloqueadas com 2% albumina (diluído em TBS) durante 60 min a temperatura ambiente (Ver seção 5.2.7). Após este procedimento, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário (ver Tabela 2) anti HO-1 (mouse, 32 kDa, Santa Cruz, 1:500) e anti β-actina (mouse, 43 kDa, Santa Cruz, 1:2.000) como controle de carga proteica, ambos anticorpos foram diluídos em uma solução contendo TBS-T junto com 2% albumina. Logo em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (ver Tabela 2) anti-mouse HRP conjugado (Millipore, 1:2.500 diluído em TBS-T junto com 2% albumina)

durante 60 min e a imunorreação das bandas foi realizada utilizando um kit de quimiluminescência (Western Blotting Luminol Reagent, código sc-2048, Santa Cruz, Brasil) e as imagens foram obtidas utilizando um fotodocumentador ChemiDoc©Bio-Rad do LAMEB/CCB/UFSC. A densidade das bandas foi avaliada por DO no programa ImageLab versão 5.2.1 (©Bio-Rad *laboratories*). O imunconteúdo de HO-1 foi determinado como a razão entre a DO da banda de HO-1 e a DO da β -actina. Os dados foram expressos como percentagem (MANOSSO *et al.*, 2017).

6.2.6 Análise estatística

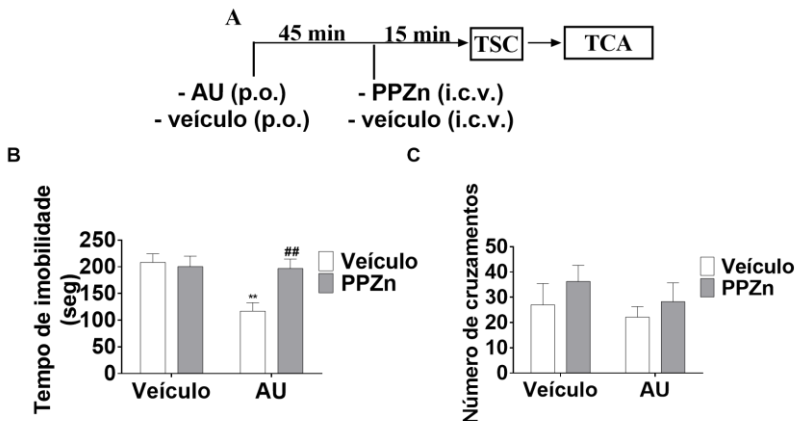
A comparação entre os grupos experimentais e controles foi analisada por análise de variância (ANOVA) de duas vias e quando apropriado, as análises foram seguidas do teste *posthoc* Newman-Keuls. A análise do imunconteúdo de HO-1 foi realizada pelo teste *t* de *Student* unilateral. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados de todos os experimentos foram expressos como a média + E.P.M. e analisados utilizando o programa *StatSoft* v. 7 e os gráficos foram realizados com o software *GraphPad Prism* v. 5.0.

6.3 RESULTADOS

Um grupo de animais recebeu uma dose efetiva de PPZn (10 $\mu\text{g/sitio}$, i.c.v.) 15 min antes do TSC para avaliar se um inibidor da HO-1 altera o efeito anti-immobilidade do AU (0,1 mg/kg, p.o.) (Fig. 6.1A). A análise estatística por ANOVA revelou uma diferença significativa entre os grupos e indicou que PPZn preveniu o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC ($p < 0,05$) (Fig. 6.1B). A análise de *posthoc* Newman Keuls revelou uma diferença no grupo tratado com AU ($F_{[1,24]} = 7,45, p < 0,05$), com PPZn

($F_{[1,24]} = 4,29, p < 0,05$) e na interação entre AU e PPZn ($F_{[1,24]} = 6,41, p < 0,05$). Por outra parte, a ANOVA de 2 vias não revelou diferenças no número de cruzamentos no TCA no grupo tratado com AU ($F_{[1,24]} = 0,89, p > 0,05$), com PPZn ($F_{[1,24]} = 1,29, p > 0,05$) e na interação entre AU e PPZn ($F_{[1,24]} = 0,05, p > 0,05$). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora dos animais ($p > 0,05$) (Fig. 6.1B).

Figura 6.1: Inibição da HO-1 por PPZn no efeito tipo-antidepressivo do AU

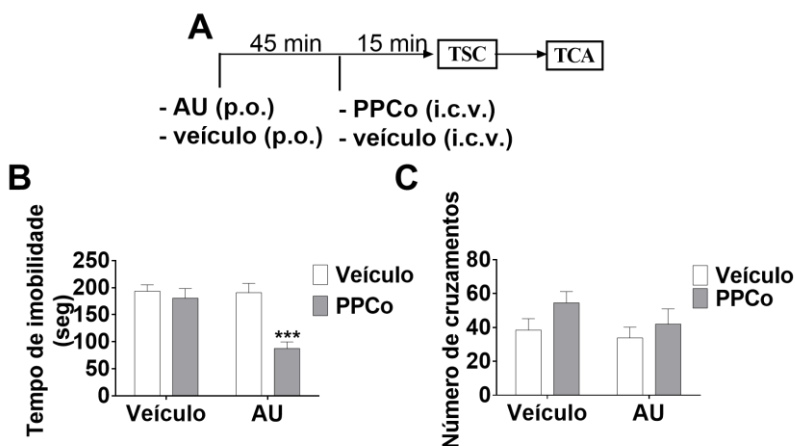


Protocolo experimental (A). Efeito da administração de PPZn (10 µg/sítio, i.c.v.) ou veículo no Tempo de imobilidade de camundongos tratados com AU (0,1 mg/kg, p.o.) ou veículo no TSC (B) e no Número de cruzamentos no TCA (C). Os valores estão expressos como média + E.P.M, n = 7. ** $p < 0,01$ quando comparado com veículo, ## $p < 0,01$ quando comparado com AU (Teste ANOVA de 2 vias seguido do *posthoc* Newman Keuls).

Para reforçar a hipótese de que a ativação de HO-1 está envolvida no efeito anti-immobilidade do AU, outro grupo de camundongos (n = 8) recebeu uma combinação de doses sub-efetivas de AU (0,01 mg/kg, p.o.), sub-efetivas de PPCo (0,01 µg/sítio, i.c.v.) ou veículo (Fig. 6.2A). A análise estatística de ANOVA de 2 vias revelou uma diferença entre os grupos indicando um sinergismo no tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao TSC entre PPCo e AU (Fig. 6.2B). A análise de *posthoc*

demonstrou diferenças no grupo AU ($F_{[1,28]} = 10,14, p < 0,01$), PPCo ($F_{[1,28]} = 14,89, p < 0,001$) e na interação AU versus PPCo ($F_{[1,28]} = 8,96, p < 0,01$). Por outra parte, a figura 6.2C mostra que este efeito não foi devido a uma indução psicoestimulante desde que nenhuma das drogas causou uma alteração na atividade locomotora dos animais. A análise estatística ANOVA de 2 vias demonstra que não houve diferenças no grupo tratado com AU ($F_{[1,28]} = 2,64, p > 0,05$), com PPCo ($F_{[1,28]} = 2,13, p > 0,05$) e na interação AU versus PPCo ($F_{[1,28]} = 0,01, p > 0,05$).

Figura 6.2: Efeito tipo-antidepressivo sinérgico de um indutor de HO-1 (PPCo) em combinação com o AU no TSC



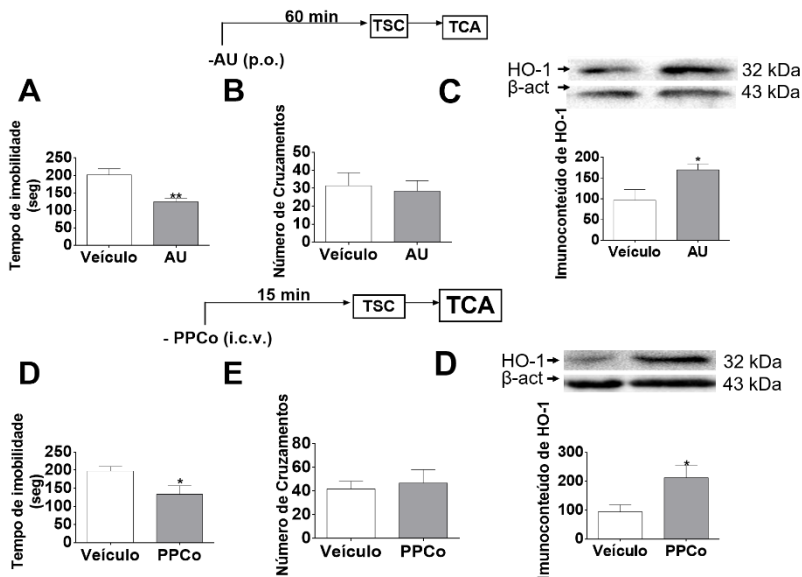
Protocolo experimental (A). Efeito da administração de PPCo (0,01 $\mu\text{g}/\text{sítio}$, i.c.v.) ou veículo no Tempo de imobilidade de camundongos tratados com AU (0,01 mg/kg , p.o.) ou veículo no TSC (B) e no Número de cruzamentos no TCA (C). Os valores estão expressos como média + E.P.M, $n = 8$. *** $p < 0,001$ quando comparado com AU (Teste ANOVA de 2 vias seguido do teste *posthoc* de Newman Keuls).

Na seguinte etapa do trabalho foi investigado o imunoconteúdo de HO-1 em homogenatos de hipocampo ($n = 4$) obtidos de camundongos tratados com: a) controle (veículo) ou b) AU durante 60 min (0,1 mg/kg , p.o.), cujos tecidos foram retirados imediatamente após o término dos testes

comportamentais. Este experimento teve o objetivo de reforçar a nossa hipótese de que o AU é capaz de induzir a HO-1 no hipocampo dos animais. Assim como descrito previamente, a administração de AU (0,1 mg/kg, p.o.) exerceu uma redução no tempo de imobilidade dos camundongos quando submetidos ao TSC ($t_{(12)} = 3,82; p < 0,01$) (Fig. 6.3A), sendo que o número de cruzamentos destes animais no TCA não foi alterado em nenhum dos tratamentos ($t_{(12)} = 0,32; p > 0,05$) (Fig. 6.3B). A análise estatística semi-quantitativa da densitometria ótica dos imunoblots revelou que o imunoconteúdo de HO-1 foi incrementado no hipocampo dos animais tratados com AU se comparado com os animais tratados com o veículo ($t_{(6)} = 2,48; p < 0,05$) (Fig. 6.3C).

Em um experimento adicional corroboramos o papel da ativação de HO-1 na resposta comportamental tipo-antidepressiva no TSC mediante a administração de uma dose efetiva de PPCo (PPCo 0,1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) em camundongos. A figura 6.3D mostra que a administração de PPCo promoveu uma redução no tempo de imobilidade dos camundongos no TSC ($t_{(12)} = 2,37; p < 0,05$), e que o número de cruzamentos destes animais no TCA não foi alterado ($t_{(12)} = 0,38; p > 0,05$) (Fig. 6.3E). A análise estatística semi-quantitativa da densitometria ótica dos imunoblots revelou que o imunoconteúdo de HO-1 também foi aumentado no hipocampo dos animais tratados com PPCo em relação aos animais tratados com o veículo ($t_{(10)} = 2,40; p < 0,05$) (Fig. 6.3F).

Figura 6.3: Efeito da administração de AU ou PPCo sobre o tempo de imobilidade e o nível de HO-1 no hipocampo de camundongos



Efeito anti-imobilidade no TSC (A, D) e atividade locomotora no TCA (B, E) de camundongos tratados com AU (0,1 mg/kg, p.o., $n = 7$) (A-B) ou PPCo (D-E) (0,1 $\mu\text{g/sitio}$, i.c.v., $n = 7$). A parte superior das figuras C e F ilustra os imunoblots representativos para o imunoconteúdo de HO-1 e β -actina. O histograma de colunas representa a semi-quantificação por densitometria ótica da razão da DO de HO-1 e da DO de β -actina de camundongos tratados com veículo ou AU ($n = 4$) durante 60 min (0,1 mg/kg, p.o., C) e de camundongos tratados com veículo ou PPCo ($n = 6$) durante 15 min (0,1 $\mu\text{g/sitio}$, i.c.v., F). A expressão de HO-1 foi semi-quantificada pela razão da DO de HO-1 e da DO da banda de β -actina. Os resultados estão expressos como porcentagem (média + E.P.M., * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado com veículo (Teste *t* de Student unilateral).

6.4 DISCUSSÃO

O efeito tipo-antidepressivo do AU em testes preditivos de atividade antidepressiva em camundongos já foi demonstrado em trabalhos prévios do nosso grupo e evidenciados no Capítulo I desta Tese. Ainda, foi verificado o efeito tipo-antidepressivo e anti-estresse deste composto em modelos animais que mimetizam os parâmetros comportamentais e

bioquímicos do distresse relacionados com o TDM (COLLA, 2015). Estes efeitos tipo-antidepressivos do AU em camundongos parecem ser associados em parte com a ativação de vias de sinalização intracelular dependentes de PKA, MEK/ERK, PKC e CaMKII (Capítulo I desta Tese). Ainda, a literatura sugere que o sistema serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico parecem estar envolvidos neste efeito do AU (MACHADO *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014). Entretanto, até o momento não tinha sido verificado o papel da HO-1 no efeito anti-imobilidade deste composto em camundongos no TSC, portanto, os nossos dados evidenciam pela primeira vez a participação da HO-1 e contribuem para desvendar os mecanismos tipo-antidepressivos do AU.

A via de sinalização dependente de Nrf2/HO-1 constitui um dos principais componentes envolvidos na defesa antioxidante (NGUYEN *et al.*, 2009). De fato, este mecanismo parece estar envolvido em diversos processos de neuroproteção frente à isquemia cerebral (NIMURA *et al.*, 1996; SHIN *et al.*, 2009; ZEYNALOV *et al.*, 2009), a neuroinflamação (LINKER *et al.*, 2011) e frente a insultos oxidativos em modelos *in vitro* (SCHIPPER, 2000; LIN *et al.*, 2012; CHEN, 2014). Nesse sentido, uma redução nos níveis de HO-1 já foi detectada no soro e no sangue de pacientes acometidos pelo TDM (RYBKA *et al.*, 2013; ROBACZEWSKA *et al.*, 2016). Ainda, a literatura corrobora com este fato, sendo que a ativação de HO-1 parece estar envolvida na resposta aos antidepressivos convencionais (ABDEL-WAHAB e SALAMA, 2011; MARTÍN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). De fato, já foi previamente relatado que compostos com atividade tipo-antidepressiva parecem atuar em parte por meio da indução de HO-1 (BETTIO *et al.*, 2014; MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2016). No presente trabalho, demonstramos que a indução de HO-1 é requerida, pelo menos em parte,

pelo AU para exercer um efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao TSC. Em concordância com nossos achados, a ativação de HO-1 está envolvida também nos efeitos neuroprotetores do AU frente à isquemia cerebral (LI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016) e frente ao traumatismo encefálico (DING *et al.*, 2017) em roedores. Um fato interessante é que no trabalho de DING e col., (2017) o efeito indutor do AU sobre HO-1 foi associado com um efeito neuroprotetor, sendo que o tratamento dos camundongos com AU promoveu a sobrevivência dos neurônios do córtex dos animais submetidos ao protocolo de traumatismo encefálico (DING *et al.*, 2017). Nesse sentido, compostos triterpenóides parecem ser capazes de induzir a expressão de HO-1, o qual já foi associado com seus efeitos neuroprotetores (SCAPAGNINI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012) e antioxidantes em roedores (GRASSMANN, 2005; GONZALEZ-BURGOS e GOMEZ-SERRANILLOS, 2012). Este efeito poderia estar relacionado com a capacidade destes compostos em interagir com os grupos sulfidrila de Keap1, o qual inibe a sua interação com Nrf2 que, em consequência, pode ativar Nrf2 e induzir a expressão de enzimas antioxidantes (KUMAR *et al.*, 2014; MAGESH, CHEN e HU, 2012). Notavelmente, já foi demonstrado que o efeito neuroprotetor do AU é perdido nos animais Nrf2^{-/-} (DING *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2013).

Outros efeitos do AU parecem também depender da modulação da atividade de HO-1. Em particular, a ação antitumoral do AU em células Kasumi-1 (derivadas de leucemia mieloide) parece depender da inibição da HO-1 (MA *et al.*, 2014). Mais importante ainda, os mesmos autores reportaram que, à diferença das concentrações altas (16 µM), uma concentração baixa (1 µM) de AU induz a atividade de HO-1 nas mesmas células (MA *et al.*, 2014). Estas evidências sugerem que o efeito do AU

sobre a atividade de HO-1 pode depender do alvo celular e da concentração que este pode atingir na célula.

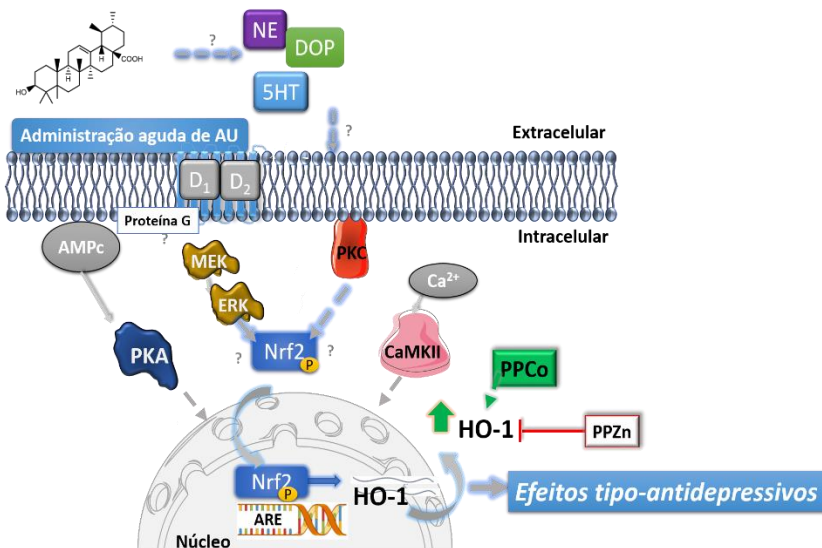
Para demonstrar o papel da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do AU, no presente trabalho utilizamos dois moduladores farmacológicos de HO-1: a PPZn e a PPCo. O primeiro preveniu o efeito do AU entanto que, a administração conjunta de doses sub-efetivas de AU com doses sub-efetivas de PPCo induziu um comportamento tipo-antidepressivo nos camundongos quando submetidos ao TSC. O modulador PPZn atua como um substrato que compete com heme e, conseqüentemente inibe a atividade de HO-1. Por outro lado, PPCo constitui um dos mais potentes indutores de HO-1 e atua como análogo sintético de heme. A especificidade de PPCo e PPZn em atuar como indutor e inibidor da atividade de HO-1 já foi amplamente verificada em diversos modelos animais e em estruturas tanto do SNC quanto em tecidos periféricos (MAINES e KAPPAS, 1974; MAINES e SINCLAIR, 1977; MAINES, 1981). Em concordância com a literatura (CUNHA *et al.*, 2016), os nossos dados evidenciaram que o tratamento com PPCo parece produzir um efeito anti-imobilidade nos camundongos quando foram submetidos ao TSC.

Um dos resultados mais interessantes deste trabalho reside no fato de que no nosso estudo, o nível de HO-1 no hipocampo dos camundongos tratados com AU foi aumentado em relação aos níveis desta proteína no hipocampo de animais tratados com o veículo. Este dado concorda com achados prévios onde já foi observado que o tratamento com AU parece aumentar a transcrição e a expressão de HO-1 em camundongos (LI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016; DING *et al.*, 2017). Mais interessante ainda, este efeito foi semelhante ao efeito indutor de PPCo sobre HO-1 no hipocampo dos camundongos. De fato, esta é a primeira vez que se demonstra bioquimicamente a associação entre o efeito tipo-antidepressivo de PPCo

em camundongos com a sua capacidade de induzir a expressão de HO-1 no hipocampo dos animais. Diversos estudos têm associado o efeito tipo-antidepressivo de compostos com a sua capacidade de induzir a expressão de HO-1, como a creatina (CUNHA *et al.*, 2016) e o zinco (MANOSSO *et al.*, 2017).

Estudos prévios têm demonstrado que as vias de sinalização dependentes em parte de PKC (ZHANG *et al.*, 2013) e MEK/ERK (XU *et al.*, 2006) podem atuar regulando a ativação de Nrf2 e, indiretamente modular sobre a expressão de HO-1. De fato, nossos dados têm evidenciado que o efeito tipo-antidepressivo do AU pode ser mediado pela ativação destas proteínas cinases (ver Capítulo I desta Tese). Por tanto, estes achados sugerem que os efeitos comportamentais do AU em camundongos no TSC podem depender da atividade de HO-1 e a sua influência sobre as vias de sinalização dependentes de PKC e MEK/ERK.

Figura 6.4: Papel da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC



Evidências da literatura demonstram que o efeito tipo-antidepressivo da administração aguda de AU (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC é dependente da disponibilidade de monoaminas em fenda sináptica e ativação de receptores D₁ e D₂. Além disso, os resultados do capítulo I desta Tese sugerem que o efeito comportamental do AU no TSC parece estar associado em parte com a ativação de PKA, PKC, MEK/ERK e CaMKII. Evidências do capítulo 2 desta Tese sugerem que a ativação de HO-1 parece estar envolvida no efeito anti-imobilidade do AU no TSC em camundongos. Esta hipótese está evidenciada pelo fato de que PPZn (um inibidor de HO-1) aboliu o efeito tipo-antidepressivo do AU. Ainda, a combinação de doses sub-efetivas de PPCo (indutor de PPCo) junto com doses sub-efetivas de AU induziram um efeito tipo-antidepressivo nos camundongos submetidos ao TSC. Em conjunto, a ativação de vias de sinalização dependentes de PKC e MEK/ERK associadas com a modulação de HO-1 podem mediar em parte os efeitos tipo-antidepressivos do AU no TSC em camundongos. Finalmente, o tratamento agudo de camundongos com AU induziu a expressão de HO-1 no hipocampo dos animais. *Abreviaturas: 5-HT, serotonina; elemento responsivo a antioxidantes, ARE; ácido ursólico, AU; Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, AMPc; proteína cinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina II, CaMKII; dopamina, DOP; receptores de dopamina tipo 1 e 2, D1; D2; proteína cinase regulada por sinal extracelular, ERK; heme oxigenase 1; HO-1; proteína cinase ativada por mitógeno, MEK; proteína cinase A, PKA; proteína cinase C, PKC; protoporfirina de cobalto, PPCo; protoporfirina de zinco, PPZn; fator nuclear derivado de eritrócitos tipo 2, Nrf2.* A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>)

7. Capítulo III. INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR IN VITRO DO ÁCIDO URSÓLICO

Trabalhos do nosso grupo demonstraram que o AU apresenta um efeito tipo-antidepressivo em diferentes testes preditivos de atividade antidepressiva (COLLA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2012), o qual parece depender de vias intracelulares envolvidas em mecanismos de sobrevivência celular (POPOLI *et al.*, 2000) (Ver Capítulo I). O AU também foi capaz de proteger frente às alterações comportamentais (fenótipo tipo-depressivo) e bioquímicas induzidas em um modelo de ECI ou pela administração crônica de corticosterona em camundongos (COLLA, 2015). A partir destas observações estabelecemos o seguinte objetivo geral: investigar o potencial neuroprotetor do AU e seus mecanismos celulares e moleculares envolvidos frente ao estresse celular induzido pela corticosterona em células HT22. A exposição de células HT22 à corticosterona tem sido utilizada para investigação do mecanismo intracelular de ação de alguns compostos antidepressivos (BEHL *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2015). Parte deste capítulo foi realizado sob supervisão da Profa. Dra. Manuela G. López no Laboratório 4 do Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid/UAM (Madri, Espanha).

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da corticosterona e do AU sobre a viabilidade de células HT22.
- Investigar o potencial citoprotetor do AU frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona.

- Investigar o mecanismo de morte celular pelo qual o AU protege da citotoxicidade induzida pela corticosterona.
- Investigar a participação de vias de sinalização intracelular no efeito citoprotetor do AU frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona.
- Investigar o efeito da exposição de células HT22 à corticosterona, o AU ou co-incubadas com AU e corticosterona sobre o imunconteúdo de HO-1.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Drogas

Foram utilizados: AU, RU486, LY294002, H-89, queleritrina, KN-62, rapamicina e corticosterona dissolvidos 100% em DMSO, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium (MTT), ácido 2—etanossulfônico (HEPES), SDS, laranja de acridina, iodeto de propídeo (IP), Hoechst 33342, e Tritón X-100 obtidos da Sigma. Kit de detecção dupla para anexina V-PE e 7-aminoactinomicina D (7-AAD) obtido da BD Bioscience. O médio Eagle modificado de Dulbecco com alta glicose (do inglês, DMEM) e penicilina-estreptomomicina obtidos da Gibco. Soro fetal bovino (SFB), tripsina 0,05% e EDTA obtidos da Invitrogen. L-glutamina e bicarbonato de sódio (NaHCO_3) obtidos da VeTEC.

7.2.2 Cultura de células HT22

As células de hipocampo de camundongos HT22 (doadas pelo Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré) foram cultivadas em placa de Petri estéril e livre de DNA/RNAase contendo meio DMEM com alta glicose (pH 7,4) suplementado com 10% SFB inativado por calor, antibióticos, L-glutamina e HEPES, e mantidas a 37°C e 5% CO_2 até atingir 90% da confluência. As

células foram lavadas com 100 mM tampão fosfato salina (PBS) (pH 7,4 a 37°C), descoladas da placa utilizando tripsina 0,05%, sendo a reação enzimática detida adicionando meio DMEM suplementado com 10% SFB como descrito previamente (FREITAS *et al.*, 2015). As culturas foram mantidas pelo menos durante 3 passagens para permitir a sincronização das fases do ciclo celular antes do começo dos experimentos. As células foram utilizadas desde a 3^a até a 10^a passagem como descrito previamente (FREITAS *et al.*, 2015). Os experimentos eram conduzidos em triplicata, utilizando diferentes passagens celulares para cada experimento individual.

7.2.3 Ensaio de viabilidade celular

O MTT é um sal de tetrazólio solúvel, que nas células viáveis é convertido em formazan púrpura após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais ativas, assim permitindo avaliar a viabilidade celular. Os meios de incubação nas respectivas condições das células HT22 foram retirados e as células foram incubadas com o MTT (0,5 mg/ml) dissolvido em tampão solução balanceada salina de Hank (do inglês, HBSS) pH 7,4 por 2 h a 37°C. Após este período, o MTT foi removido e acrescentado 100 µl de DMSO para solubilizar o formazán. Finalmente, foi analisada a DO em espectrofotômetro na Multileitora Infinite M200 TECAN (λ 540 nm) do LAMEB/CCB/UFSC. A condição basal era considerada como 100% viável. A viabilidade celular é proporcional à leitura da absorbância obtida (DENIZOT e LANG, 1986).

7.2.4 Dupla marcação fluorescente para Iodeto de propídeo (IP) e Hoechst 33342

Para avaliar a integridade da membrana plasmática como um indício de morte celular, foram utilizadas duas sondas fluorescentes, o IP e o

Hoechst33342. O primeiro corante se intercala e liga-se nos ácidos nucléicos e unicamente consegue atravessar quando a membrana plasmática está danificada (RICCARDI e NICOLETTI, 2006). Por outra parte, Hoechst33342 liga-se preferentemente em regiões ricas em AT do DNA e é incorporado em todas as células. Portanto, utilizando ambos corantes é possível identificar as células intactas e as permeabilizadas ou mortas (LIU *et al.*, 2014).

Para isso, finalizados os tratamentos foram adicionados IP (1 µg/ml, diluído em DMSO) e Hoechst 33342 (5 µg/ml, diluído em DMSO) ao meio das células HT22 durante 20 minutos a 37°C. As células foram posteriormente lavadas com 100 mM PBS e observadas imediatamente em microscópio de epi-fluorescência como descrito previamente (LIU *et al.*, 2014). Para quantificar as células positivas para cada marcador, foram feitas fotografias representativas de cada poço com uma câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss, N.Y., U.S.A.) acoplada ao microscópio Axiovert 40 CFL. A quantidade de células IP⁺ (marcadas em vermelho) e Hoechst⁺ (marcadas em azul) foi analisada como partículas com o plugin “watershed” (com tamanho mínimo de 0,001 píxeis) do programa Image J versão 1.50b (NIH). A quantidade da marcação positiva para IP em relação à marcação para Hoechst foi calculada e normalizada em base ao controle basal utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade (x vezes)} = \frac{\text{Contagem IP}}{\text{Contagem Hoechst}} / \text{Basal}$$

7.2.5 Citometria de fluxo

A translocação de resíduos de fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática funciona como um dos mais importantes sinais de reconhecimento de fagocitose para células em processo de morte celular.

Esta perda da assimetria dos fosfolipídios pode ser reconhecida especificamente mediante a ligação da anexina V, uma proteína de 35-36 kDa de alta afinidade para estes fosfolipídios (FINK e COOKSON, 2005). Quando conjugada com um fluorocromo fluorescente (ficoeritrina ou PE), a anexina V pode ser analisada mediante citometria de fluxo e permite assim identificar um estágio mais precoce de apoptose. Para identificar estágios mais avançados de apoptose é possível acoplar a sonda anexina V com 7 aminoactinomicina (7-AAD), o qual é incorporado unicamente nas células com membrana danificada ou necróticas (ZEMBRUSKI *et al.*, 2012). Portanto, utilizando ambos marcadores é possível identificar as células viáveis (negativas para anexina V-PE e 7-AAD), células em apoptose precoce (positivas para anexina V-PE e negativas para 7-AAD) e células em apoptose tardia (positivas para anexina V-PE e 7-AAD).

Para avaliar a quantidade de células em processo de apoptose, foi utilizado o kit de dupla marcação com anexina V-PE e 7-AAD (BD Bioscience, Madri, Espanha, código #559763) de acordo com as instruções do fabricante. Finalizados os tratamentos, as células foram coletadas cuidadosamente por dissociação mecânica, centrifugadas e suspensas em um tampão de ligação (diluído 1x em água miliQ) contendo 5 µl anexina V-PE e 5 µl de 7-AAD. Após 15 min de incubação a temperatura ambiente, foi adicionado 200 µl de tampão de ligação 1x e cada tubo de células foi imediatamente analisado utilizando um citômetro de fluxo Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter) do Laboratorio de Citometria de Flujo da UAM. Para cada amostra foram considerados como mínimo 10.000 eventos e representados em gráficos de dot plot utilizando os softwares CXP e MXP (Beckman Coulter, Madri, Espanha). A quantidade de células apoptóticas foi calculada considerando a somatória das células

Anexina⁺/7-AAD⁻ e Anexina⁺/7-AAD⁺ e expressos como porcentagem de apoptose.

7.2.6 Análise de autofagia

A detecção de vesículas ácidas foi realizada mediante a marcação com a laranja de acridina, um corante fluorogênico acidotrópico intercalante de ácidos nucléicos que permite detectar em laranja as organelas vesiculares ácidas (AVO) e em verde a cromatina (CR) (ZHANG e LIU, 2013). No final do tratamento, as células foram brevemente fixadas durante 5 min com paraformaldeído 4% (diluído em 100 mM PBS a 37°C) e incubadas durante 20 min com a laranja de acridina (10 µg/mL diluído em 100 mM PBS) ao abrigo da luz a 37°C como descrito previamente (GUPTA e LAHIRI, 2016; SINGH *et al.*, 2016). A intensidade de fluorescência detectada nas imagens obtidas em microscópio Axiovert 40 CFL de epi-fluorescência e posteriormente foi avaliada mediante o software ImageJ v1.5 (NIH). Os valores foram expressos em porcentagens da média da intensidade de fluorescência AVO (em laranja) pela média de CR (em verde).

7.2.7 Western blotting

Para investigar os níveis de fosforilação de p38MAPK e ERK1/2 em uma curva de tempo-resposta, 1×10^6 células HT22 foram semeadas em placa de 6 poços e incubadas com a condição controle (basal) ou corticosterona (50 µM) durante 3, 6 ou 12 h em 4 experimentos independentes. Uma vez escolhido o tempo mínimo de alteração nos níveis de fosforilação de proteínas MAPKs, 5×10^5 células HT22 foram semeadas em placa de 6 poços e incubadas com a condição controle (basal), corticosterona (50 µM) durante 3 h (o menor tempo de alteração dos níveis de fosforilação), incubados durante 51 h com AU (15 µM) ou pré-

incubados durante 48 h com AU (15 μ M) seguido por uma co-incubação com AU (15 μ M) e corticosterona (50 μ M) por mais 3 h para investigar os níveis de fosforilação de p38MAPK, proteína cinase c-Jun NH2-terminal (JNK) e ERK1/2 (em 6 experimentos independentes). Em outro ensaio, 5×10^5 células HT22 foram semeadas em placa de 6 poços e tratadas com a condição controle (Basal), corticosterona (50 μ M) durante 24 h, durante 72 h com AU (15 μ M) ou pré-incubados durante 48 h com AU (15 μ M) seguido por uma co-incubação com AU (15 μ M) e corticosterona (50 μ M) por mais 24 h para investigar o imunocontéudo de HO-1 frente a estas condições (em 4 experimentos independentes).

Uma vez finalizada a incubação, o meio foi retirado, as placas foram lavadas com 100 mM PBS e as células foram dissociadas mecanicamente com a ajuda de um raspador de células e *stop solution* SDS 4% (contendo 10% SDS, 100 mM EDTA, 500 mM TRIS). Posteriormente, as amostras foram colocadas no banho-seco a 100°C principalmente para desativar as proteases durante 5 min. A continuação, as amostras foram levadas a centrifugação durante 10 min a 13.000 rpm. Finalmente, foi quantificado o conteúdo proteico das amostras utilizando como padrão a albumina seguindo o método de Peterson (PETERSON, 1977). A eletroforese foi realizada aplicando 40 μ g de proteína por condição em um minigel de 10% poliacrilamida SDS-PAGE, e posteriormente transferidos para membranas de nitrocelulose (FREITAS *et al.*, 2015). Após o bloqueio com albumina 2%, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários (ver Tabela 2): anti-p38MAPK fosforilado e total (rabbit, 38 kDa, 1/10.000, Millipore e Sigma respectivamente), anti-JNK fosforilado e total (rabbit, 46 kDa, 1/1.000, Cell signaling e Sigma respectivamente), anti-ERK1/2 fosforilado e total (rabbit, 46 kDa, 1/5.000, Cell signaling e Sigma respectivamente) e total (rabbit, 44-42 kDa, 1:20.000, Sigma), anti HO-1

(mouse, 32 kDa, Santa Cruz, 1:500) e anti- β -actina (mouse, 43 kDa, 1/2.000, Santa Cruz) *overnight* e logo após com os anticorpos secundários correspondentes (ver Tabela 2). A imunoreatividade foi detectada em um fotodocumentador ChemiDoc©Bio-Rad do LAMEB/CCB/UFSC. A medição da DO foi realizada mediante o programa ImageLab versão 5.2.1 (©Bio-Rad laboratories). Os níveis de fosforilação de p38MAPK, JNK, ERK1/2 foram semi-quantificados como a razão da sua DO respectiva em relação aos níveis totais de cada proteína. O imunocontéudo de HO-1 foi determinado como a razão da sua DO respectiva em relação à da β -actina.

7.2.8 Protocolos experimentais

Para avaliar o efeito da corticosterona e do AU sobre a viabilidade de células HT22, 5×10^3 células foram sub-cultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Após 24 h, o meio foi retirado completamente e as células foram incubadas com meio DMEM + 10% SFB junto às com os tratamentos correspondentes em uma curva concentração-resposta e tempo-resposta. Após escolher a concentração e o tempo ótimo com corticosterona e AU, em um ensaio paralelo foi avaliado o efeito neuroprotetor do AU frente à citotoxicidade da corticosterona em células HT22. Para investigar as possíveis vias intracelulares de sinalização envolvidas no efeito neuroprotetor do AU, em um ensaio paralelo 3×10^3 células HT22 foram incubadas durante 30 minutos com os tratamentos correspondentes. Ao término da incubação, as células foram avaliadas pelo ensaio colorimétrico de redução de MTT (Ver seção 7.2.3).

As concentrações e tempos de incubação de corticosterona e AU foram escolhidas em base a trabalhos prévios que demonstraram a eficácia dos tratamentos em células HT22 e em outras linhagens imortalizadas

(HEO *et al.*, 2002; SHIH *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2015). As concentrações e tempos de incubação de RU486 e dos inibidores farmacológicos foram escolhidas em base a trabalhos prévios que demonstraram a eficácia e especificidade dos tratamentos em células HT22 e em outras linhagens imortalizadas (CUNHA *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2015).

A condição como controle positivo e ativador da autofagia foi realizada de acordo com trabalhos prévios onde foi demonstrado que a incubação de células HT22 durante 24 h com o 50 nM rapamicina (inibidor de mTOR) é capaz de induzir a expressão de Beclina, uma proteína envolvida na formação de autofagossomas e ativador da autofagia (YANG *et al.*, 2015) (Ver Seção 7.3.4).

7.2.9 Análise estatística

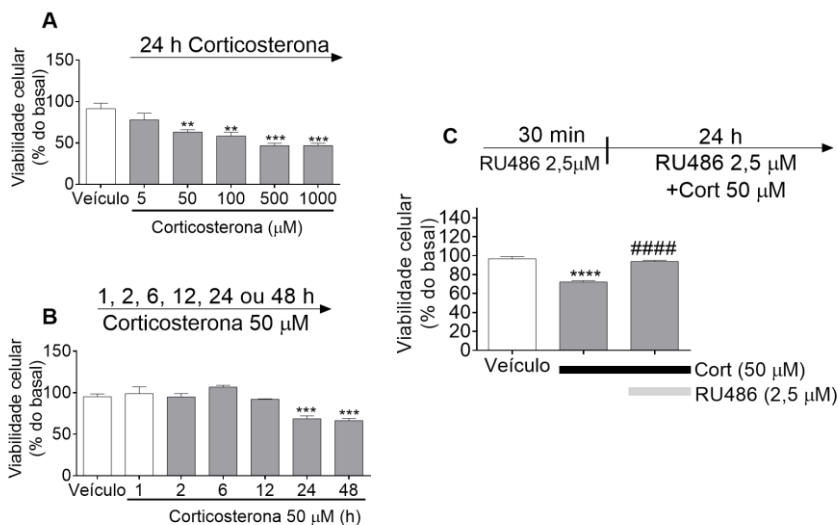
A comparação entre os grupos experimentais e controles foi analisada por ANOVA de uma via. Quando apropriado, as análises eram seguidas do teste *posthoc* Newman-Keuls. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados em todos os experimentos foram expressos com média + E.P.M e analisados utilizando o programa *StatSoft* v. 7 e os gráficos foram realizados com o software *GraphPad Prism* v. 5.0.

7.3 RESULTADOS

Inicialmente procuramos mimetizar um modelo de estresse *in vitro* incubando células hipocampais imortalizadas (HT22) de camundongo com corticosterona, com o objetivo de promover a morte celular e mimetizar os efeitos celulares e moleculares do estresse no hipocampo. Baseados em trabalhos prévios, avaliamos o efeito da incubação de células HT22 em uma curva concentração-resposta com corticosterona

sobre a viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Neste ensaio observamos que a partir de 50 μM , a corticosterona reduziu a viabilidade destas células de maneira concentração-dependente, em aproximadamente 37% das células em relação à condição controle ($F_{[5,12]} = 12,37, p < 0,01$) (Fig. 7.1A). Ainda, no ensaio de curva tempo-resposta, verificamos que o tempo mínimo de exposição à 50 μM corticosterona que reduziu a viabilidade de células HT22 corresponde a 24 h ($F_{[6,25]} = 17,90, p < 0,001$) (Fig. 7.1B). Para caracterizar se a morte celular induzida pela corticosterona depende especificamente da ativação de GR, foi utilizado 2,5 μM RU486, um antagonista de GR (Fig. 7.1C). A análise estatística revelou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{[2,12]} = 46,19, p < 0,001$), e o *posthoc* permitiu identificar que o tratamento com 50 μM corticosterona induziu uma redução da viabilidade das células em até 30% ($F_{[2,12]} = 46,19, p < 0,0001$), sendo que este efeito foi prevenido pelo tratamento com RU486 ($F_{[2,12]} = 46,19, p < 0,0001$). A partir destes experimentos, escolhemos a menor concentração e o menor tempo de incubação de corticosterona (50 μM durante 24 h) que reduziu a viabilidade das células HT22 para continuar com os experimentos.

Figura 7.1: Efeito citotóxico da corticosterona em células HT22 depende da ativação de GR



O painel A mostra o efeito da incubação em concentração-crescente com corticosterona sobre a viabilidade de células HT22 medida pelo ensaio de MTT ($n = 3$) (A). Células HT22 foram incubadas com 50 μM corticosterona em tempos crescentes ($n = 4-5$) (B). A incubação durante 30 min com 2,5 μM RU486 antes da co-incubação com 50 μM corticosterona durante mais 24 h preveniu o efeito citotóxico da corticosterona em células HT22 ($n = 3-6$) (C). Os resultados estão expressos como porcentagem do basal (média + E.P.M. Teste ANOVA de 1 via seguido do *posthoc* Newman-Keuls). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao veículo, #### $p < 0,0001$ em relação ao grupo corticosterona. Cort: corticosterona.

Em um experimento subsequente avaliamos os efeitos da incubação com AU nas concentrações de 5, 15, 25 ou 50 μM e em diferentes tempos sobre a viabilidade de células HT22 (Figura 7.2A-B). A análise estatística revelou que o AU nas concentrações de 5, 15 ou 25 μM não alterou a viabilidade das células HT22 ($F_{[4,15]} = 16,68$; $p > 0,05$). Entretanto, na

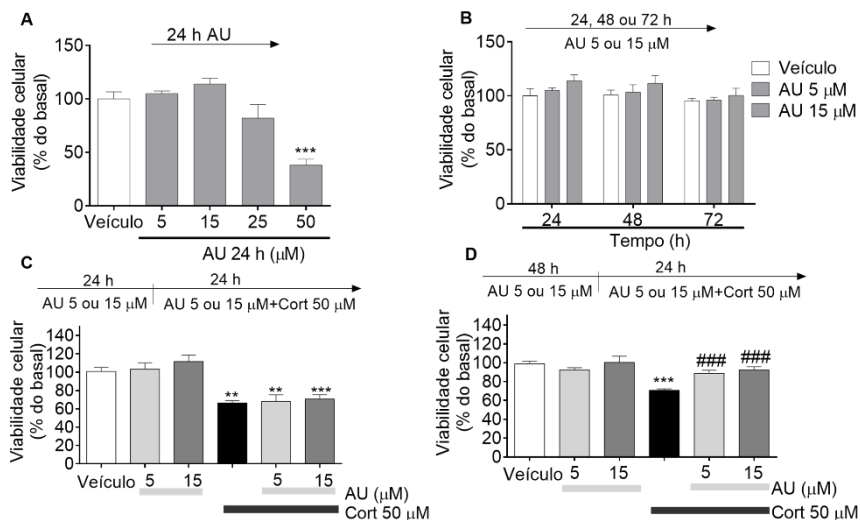
concentração de 50 μM , o AU reduziu 62% a viabilidade das células em comparação com a condição veículo ($F_{[4,15]} = 16,68, p < 0,001$) (Fig. 7.2A). Na Figura 7.2B está demonstrado o efeito da incubação de células HT22 com AU nas concentrações de 5 ou 15 μM em 3 tempo diferentes (24, 48 e 72 h), onde foi observado que nenhuma das condições afetou a viabilidade celular ($F_{[4,37]} = 0,14, p > 0,05$) (Fig. 7.2B).

Uma vez conhecidas as concentrações não tóxicas de AU, investigamos se este seria capaz de prevenir a citotoxicidade induzida pela incubação com corticosterona pelo ensaio de MTT. Portanto, testamos o efeito citoprotetor do AU na concentração de 5 ou 15 μM frente à toxicidade induzida pela corticosterona. O tratamento com 50 μM corticosterona durante 24 h induziu uma redução da viabilidade celular de até 40% das células em relação ao controle ($F_{[2,30]} = 12,28, p < 0,01$). Quando as células HT22 foram incubadas por 24 h com AU (5 ou 15 μM) antes da co-incubação junto com a 50 μM corticosterona durante mais 24 h, o tratamento único com AU (5 ou 15 μM) não alterou a viabilidade celular ($F_{[2,30]} = 12,28, p > 0,05$). Nenhuma das concentrações foi capaz de prevenir o efeito citotóxico da corticosterona ($F_{[2,30]} = 12,28, p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente) (Fig. 7.2C).

Testamos também se um tempo maior de pré-incubação com AU (48 h) era capaz de prevenir a citotoxicidade induzida pela corticosterona. A partir deste segundo protocolo, a ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{[2,30]} = 8,30, p < 0,0001$). A análise de *posthoc* revelou que a incubação das células por 24 h com corticosterona reduziu 30% a viabilidade das células em relação ao veículo ($F_{[2,30]} = 8,30, p < 0,001$). Quando as células foram incubadas por 48 h com 5 ou 15 μM de AU antes da co-incubação com corticosterona, este

tratamento preveniu a citotoxicidade induzida pela corticosterona ($F_{[2,30]} = 8,30$, ambos $p < 0,001$) em relação à condição com corticosterona. Nenhum dos tratamentos com AU alterou a viabilidade das células ($F_{[2,30]} = 8,30$, $p > 0,05$) (Figura 7.2D).

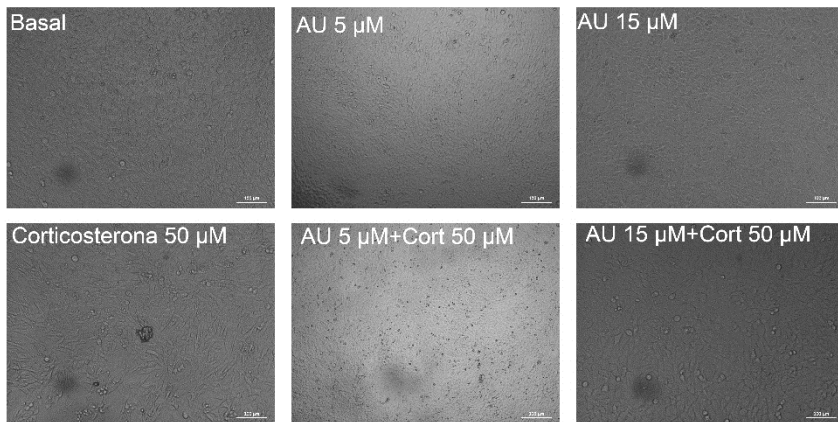
Figura 7.2: Efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade da corticosterona em células HT22



Efeito da incubação em concentração-crescente com AU sobre a viabilidade de células HT22 medida pelo ensaio de MTT ($n = 4$) (A). Células HT22 foram incubadas com AU 5 ou 15 μM durante 24, 48 ou 72 h ($n = 4-6$) (B). A incubação durante 24 h com 5 ou 15 μM AU antes da co-incubação com 50 μM corticosterona durante mais 24 h não alterou o efeito citotóxico de 50 μM corticosterona em células HT22 ($n = 6$) (C). A incubação de células HT22 durante 48 h com 5 ou 15 μM AU antes da co-incubação com 50 μM corticosterona durante mais 24 h preveniu o efeito citotóxico da corticosterona em células HT22 ($n = 6$) (D). Os resultados estão expressos como porcentagem do basal (média + E.P.M. Teste ANOVA de 1 via seguido do *posthoc* Newman-Keuls). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; em relação ao veículo, ### $p < 0,001$ em relação ao grupo corticosterona. AU: ácido ursólico, Cort: corticosterona.

A figura 7.3 ilustra imagens representativas de células HT22 observadas em microscópio de contraste Axiovert 40 CFL (AxioCam MRc 5, Carl Zeiss, NY, U.S.A.) tratadas na condição basal (DMEM + 10% SFB), durante 72 h com 5 ou 15 μM AU, por 24 h com 50 μM corticosterona ou pré-incubadas por 48 h com AU e cultivadas em conjunto com AU e corticosterona durante mais 24 h.

Figura 7.3: Microfotografias da morfologia de células HT22

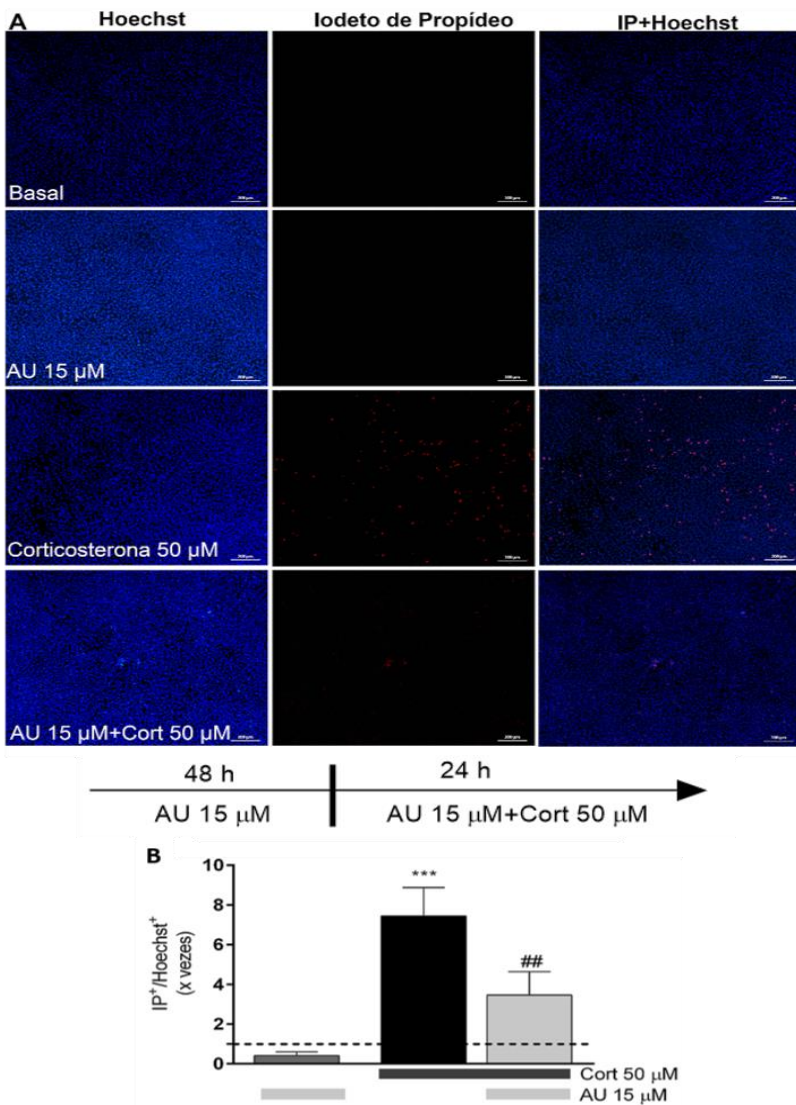


Imagens ilustrativas obtidas com uma câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss, N.Y., U.S.A.) acoplada ao microscópio Axiovert 40 CFL em contraste de fase de células HT22 incubadas em condição basal, 5 ou 15 μM AU durante 72 h ou pré-incubadas durante 48 h com 5 ou 15 μM AU e co-incubadas com 50 μM corticosterona durante mais 24 h. Barra de escala: 100 μm . AU: ácido ursólico, Cort: corticosterona.

A presença de células necróticas e com a membrana plasmática danificada foi avaliada mediante uma dupla marcação com as sondas fluorescentes IP e Hoechst33342 em células HT22 incubadas com 50 μM corticosterona ou pré-tratadas durante 48 h com 15 μM AU e co-

incubadas com 50 μM corticosterona durante 24 h (Fig. 7.4A). A análise estatística revelou uma diferença entre os grupos ($F_{[3,16]} = 12,16$, $p < 0,001$). Uma análise de *posthoc* revelou que a quantidade de células positivas para IP aumentou aproximadamente umas 8 vezes quando tratadas com 50 μM corticosterona em relação à condição basal ($F_{[3,16]} = 12,16$, $p < 0,001$) (Fig. 7.4B). Este aumento de células mortas foi reduzido pela metade quando as células foram expostas ao pré-tratamento com 15 μM AU ($F_{[3,16]} = 12,16$, $p < 0,01$).

Figura 7.4: Análise da morte celular em células HT22 tratadas com corticosterona ou AU

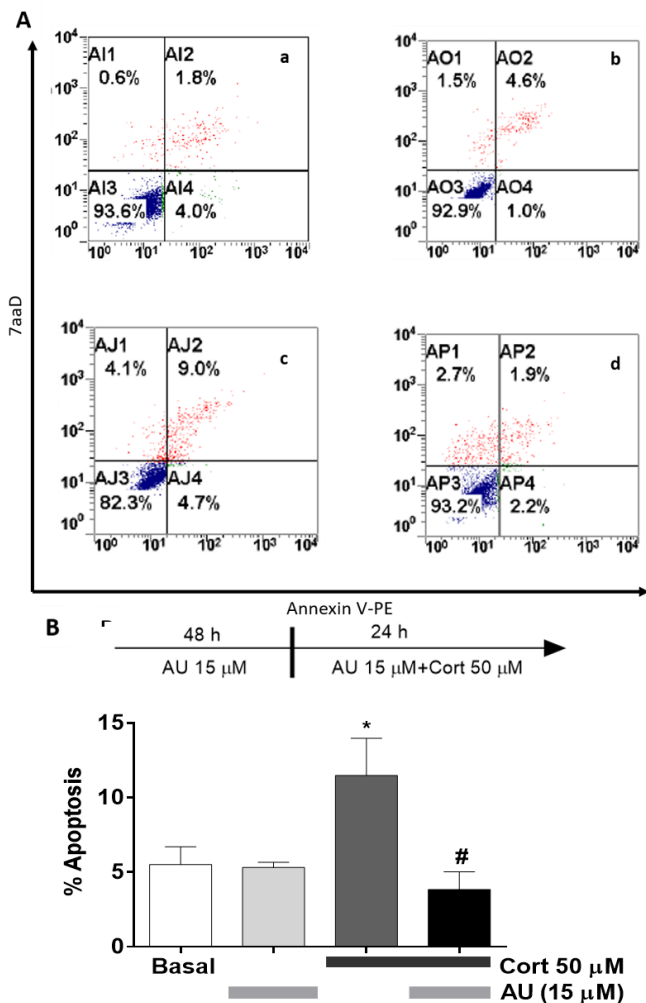


Microfotografias fluorescentes representativas obtidas com a dupla marcação para IP/Hoechst sobre células HT22 tratadas em condição basal, 15 μ M AU durante 72 h, 50 μ M corticosterona durante 24 h, ou pré-tratadas durante 48 h

com 15 μM AU e co-tratadas com 50 μM corticosterona. Barra de escala: 200 μm (A). O tratamento com corticosterona induziu um aumento de até 8 vezes a quantidade de células marcadas com IP. Este efeito foi prevenido pela incubação com AU (B). A quantidade de células $\text{IP}^+/\text{Hoechst}^+$ foi calculado a partir de 5 experimentos independentes utilizando o algoritmo de análise de partículas de ImageJ. Os resultados estão expressos como quantidade de vezes em relação ao basal (média + E.P.M., Teste ANOVA de 1 via seguido do *posthoc* Newman-Keuls). *** $p < 0,001$; em relação ao basal, ## $p < 0,01$ em relação ao grupo corticosterona. AU: ácido ursólico, Cort: corticosterona, IP: Iodeto de propídeo.

Em outro ensaio, foi avaliado o efeito do AU sobre a quantidade de células em processo de apoptose quando expostas à 50 μM corticosterona durante 24 h, com 15 μM AU durante 72 h, ou pré-tratadas durante 48 h com 15 μM AU e posteriormente co-tratadas com 50 μM corticosterona (Fig. 7.5). A análise de dot plot resultante da citometria das células HT22 com a seguinte marcação: $\text{Anexina}^+/\text{7-AAD}^-$ (apoptose precoce) e $\text{Anexina}^+/\text{7-AAD}^+$ (apoptose tardia) (Fig. 7.5A) por ANOVA de 1 via revelou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{[3,12]} = 4,99$, $p < 0,01$). Uma análise de *posthoc* mostrou que a condição tratada com corticosterona induziu um aumento de cerca de 2 vezes na quantidade de células em apoptose se comparada com a condição basal ($F_{[3,12]} = 4,99$, $p < 0,05$). Este aumento foi prevenido pela pré-incubação das células HT22 com 15 μM AU durante 48 h e co-tratadas com 50 μM corticosterona ($F_{[3,12]} = 4,99$, $p < 0,05$) (Fig. 7.5B).

Figura 7.5: Análise do efeito citoprotetor do AU sobre a apoptose induzida pela corticosterona em células HT22

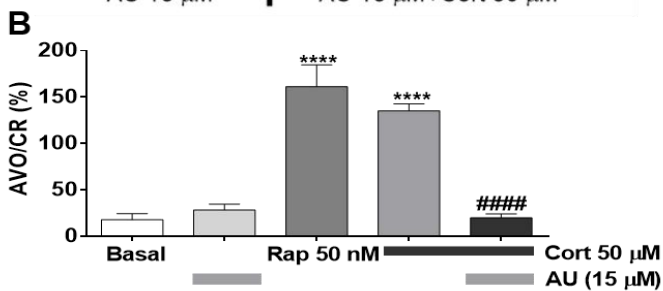
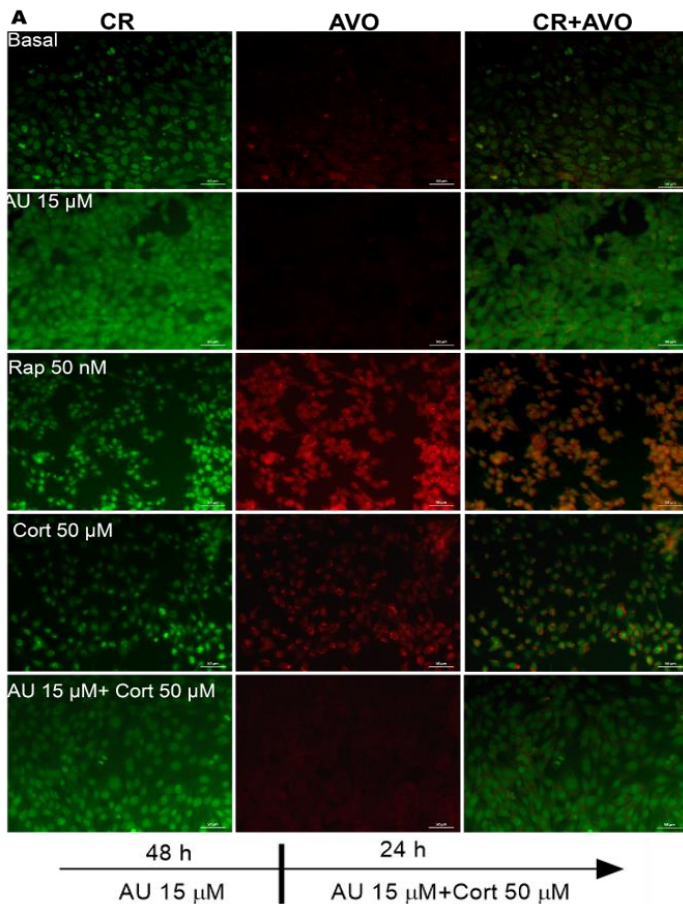


Diagramas de dot plot representativos de células HT22 na condição a) basal, b) 15 μ M AU durante 72 h, c) 50 μ M corticosterona durante 24 h e, d) pré-incubadas durante 48 h com 15 μ M AU seguido da co-incubação com 50 μ M corticosterona durante 24 h (A). Após o tratamento, as células HT22 foram coletadas, marcadas com anexina V-PE e 7-AAD, e analisadas por citometria de fluxo. Quantificação da análise por FACS de células positivas para anexina e 7-

AAD (B). Os resultados estão expressos como percentagem de células apoptóticas Anexina⁺/7-AAD⁻ e Anexina⁺/7-AAD⁺ de 4 experimentos independentes (Média + E.P.M., Teste ANOVA de 1 via seguido do *posthoc* Newman–Keuls). * $p < 0,05$; em relação ao basal, # $p < 0,05$ em relação ao grupo corticosterona. AU: ácido ursólico, Cort: corticosterona.

A citotoxicidade induzida pela corticosterona pode ser mediada em parte por mecanismos de morte celular por autofagia. Portanto, em outro conjunto de experimentos, avaliamos a presença de AVO e de CR com o corante laranja de acridina em células HT22. A figura 7.6A ilustra imagens representativas da presença de AVO (em vermelho), CR (em verde) e a combinação AVO+CR de células HT22 tratadas em condição basal, com 15 μM AU durante 72 h, com 50 nM rapamicina durante 24 h, 50 μM corticosterona durante 24 h, ou pré-tratadas durante 48 h com 15 μM AU e posteriormente co-tratadas com 50 μM corticosterona. A análise estatística por ANOVA de uma via da quantificação da intensidade de fluorescência em cada condição mediante ImageJ permitiu revelar uma diferença significativa entre os grupos ($F_{[4,15]} = 34,15$, $p < 0,0001$). A análise utilizando o *posthoc* revelou que o tratamento com corticosterona e rapamicina induziu incremento de até 8 e 9 vezes respectivamente na percentagem de AVO/CR em relação à detectada na condição basal ($F_{[4,15]} = 34,15$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$ respetivamente). O tratamento prévio das células HT22 com 15 μM AU durante 48 h e co-incubadas com 50 μM corticosterona preveniu este incremento ($F_{[4,15]} = 34,15$, $p < 0,0001$) (Fig. 7.6B).

Figura 7.6: Análise da autofagia em células HT22 tratadas com corticosterona ou AU



Microfotografias de fluorescência representativas da presença de AVO, CR e a combinação AVO+CR obtidas de células HT22 coradas com laranja de acridina

nas condições: basal, 15 μM AU durante 72 h, 50 nM Rapamicina durante 24 h, 50 μM corticosterona durante 24 h, pré-tratadas com 15 μM AU durante 48 h e co-tratadas com 50 μM corticosterona durante mais 24 h. Barra de escala: 50 μm (A). O tratamento com corticosterona e rapamicina incrementou a percentagem de AVO/CR em relação à condição basal. O tratamento com AU não alterou a presença de AVO/CR e, a pré-incubação durante 48 h com AU antes da incubação com corticosterona previno o incremento da intensidade de fluorescência AVO/CR (B). Os resultados estão expressos como percentagem da intensidade de fluorescência AVO/CR analisados mediante o software ImageJ e calculados a partir de 4 experimentos independentes (Média + E.P.M., Teste ANOVA de 1 via seguido do *posthoc* Newman-Keuls). **** $p < 0.0001$ em relação à condição basal; #### $p < 0.0001$ em relação à corticosterona. AU: ácido ursólico, AVO: organelas vesiculares ácidas, Cort: corticosterona, CR: cromatina, Rap: rapamicina.

Para investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito citoprotetor do AU frente à citotoxicidade da corticosterona, as células HT22 foram incubadas durante 30 min com diversos inibidores farmacológicos que continuaram presentes durante a pré-incubação com AU e a co-incubação com corticosterona (seguindo o protocolo da figura 7.7A) para assim avaliar a viabilidade celular mediante o ensaio de MTT. Os seguintes inibidores farmacológicos de proteínas cinase foram utilizados: 3 μM LY294002 (inibidor de PI3K), 10 μM KN-62 (inibidor de CaMKII), 2 μM H-89 (inibidor de PKA) e 0,1 μM queleritina (inibidor de PKC).

A figura 7.7B demonstra o efeito do tratamento com 3 μM LY294002 (inibidor de PI3K) sobre o efeito citoprotetor do 15 μM AU frente à 50 μM corticosterona. A análise estatística revelou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{[4,21]} = 7,73, p < 0,001$). A análise de *posthoc*

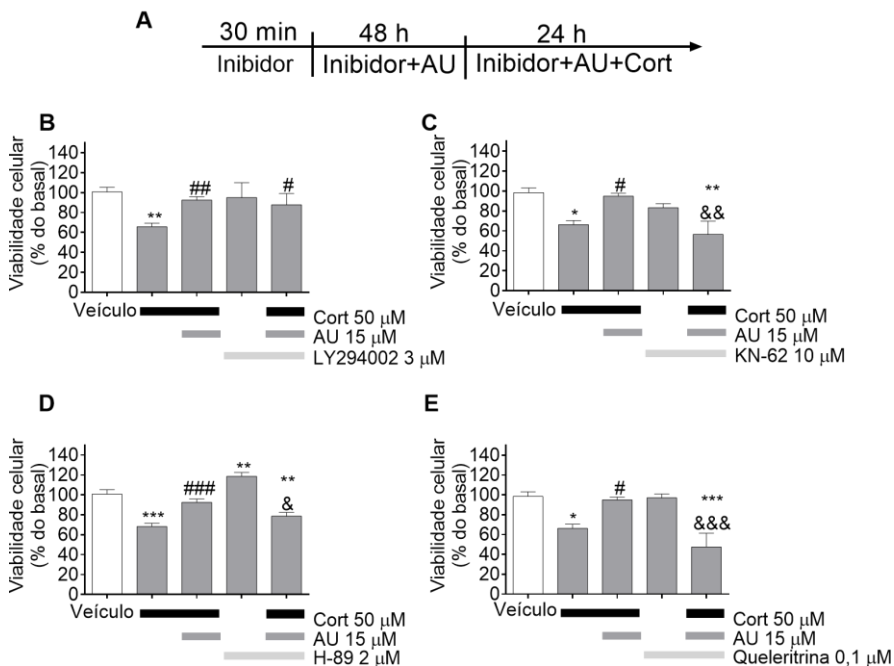
segundo Newman Keuls revelou que o tratamento com LY294002 não alterou a viabilidade celular ($F_{[4,21]} = 7,73, p > 0,05$) nem preveniu o efeito citoprotetor do AU frente a corticosterona ($F_{[4,21]} = 7,73, p > 0,05$).

Em outro experimento, testamos o efeito de 10 μM KN-62 (inibidor de CaMKII), sobre a citoproteção de 15 μM AU frente à 50 μM corticosterona nas células HT22. Como demonstrado na figura 7.7C, a incubação das células HT22 unicamente com KN-62 não alterou a viabilidade celular ($F_{[4,20]} = 6,35, p > 0,05$), mas o co-tratamento preveniu o efeito citoprotetor do AU frente à citotoxicidade da corticosterona em células HT22 ($F_{[4,20]} = 6,35, p < 0,01$).

Um grupo de experimentos também foi realizado para investigar o efeito da incubação com 2 μM H-89 (inibidor de PKA) sobre o efeito citoprotetor do 15 μM AU frente à 50 μM corticosterona (Fig. 7.7D). A análise estatística revelou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{[4,21]} = 23,48, p < 0,0001$). Uma análise de *posthoc* revelou que o tratamento das células HT22 unicamente com H-89 aumentou a viabilidade ($F_{[4,21]} = 23,48, p < 0,01$) e, o co-tratamento inibiu o efeito citoprotetor do AU ($F_{[4,21]} = 23,48, p < 0,05$).

A continuação investigamos se o bloqueio da atividade de PKC com o inibidor queleritina podia alterar o efeito citoprotetor do AU frente à corticosterona (Fig. 7.7E). A análise estatística revelou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{[4,20]} = 9,78, p < 0,001$). A análise de *posthoc* revelou que o tratamento unicamente com 0,1 μM queleritina não alterou a viabilidade celular ($F_{[4,20]} = 9,78, p > 0,05$) mas a co-incubação com AU e corticosterona preveniu o efeito citoprotetor do AU frente à corticosterona ($F_{[4,20]} = 9,78, p < 0,001$).

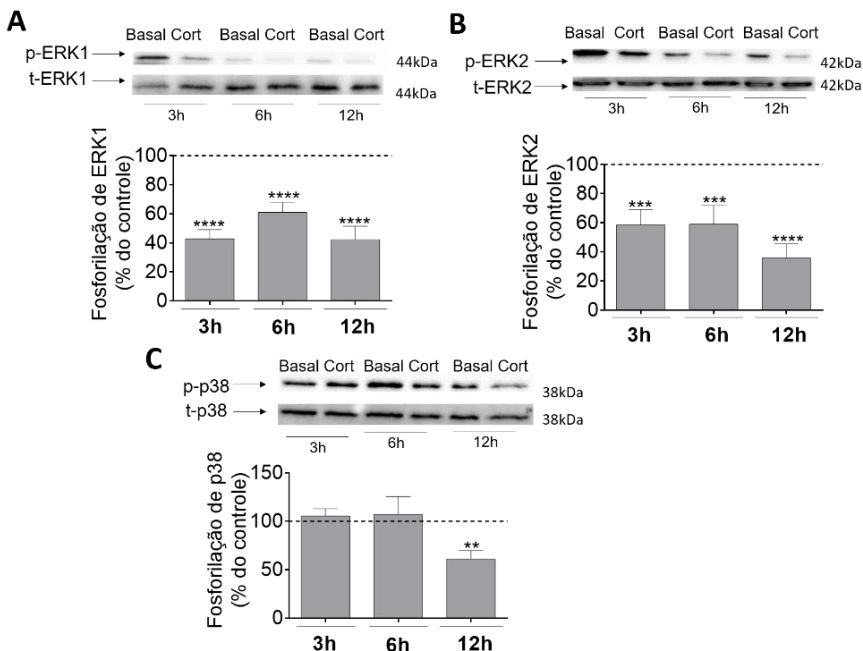
Figura 7.7: Efeito dos inibidores de proteínas cinase no efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona



Protocolo experimental (A). Células HT22 foram incubadas durante 30 min antes do tratamento com 15 μM AU com os seguintes inibidores: 3 μM LY294002 (inibidor de PI3K, $n = 3-6$, painel B), 10 μM KN-62 (inibidor de CaMKII, $n = 5$, painel C), 2 μM H-89 (inibidor de PKA, $n = 4-6$, painel D) ou 0,1 μM queleritrina (inibidor de PKC, $n = 4-5$, painel E). Os inibidores estiveram presentes durante todo o tratamento. O efeito citoprotetor do AU frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona foi prevenido por H-89, KN-62 e queleritrina, mas não pelo inibidor LY294002. Os resultados estão expressos como porcentagem do basal (média + E.P.M. Teste ANOVA de 1 via seguido do *posthoc* Newman-Keuls). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; em relação ao veículo, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ em relação ao grupo corticosterona; & $p < 0,05$; && $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$ em relação ao tratamento com AU e corticosterona. AU: ácido ursólico, Cort: corticosterona.

Em um experimento subsequente investigamos a participação de vias de sinalização dependentes de MAPKs no efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22. Para isto, inicialmente investigamos os níveis de fosforilação de p38MAPK e ERK1/2 em homogenatos de células HT22 tratadas em tempos crescentes de 3, 6 ou 12 h com 50 μ M corticosterona (Fig. 7.8). A análise semi-quantitativa da DO de imunoblots incubados com anticorpos específicos para fosfo e total-ERK1/2 revelou que os níveis de fosforilação de ERK1 foram reduzidos nas células tratadas durante 3, 6 ou 12 h com 50 μ M corticosterona ($F_{[5,18]} = 28,96$, $p < 0,0001$; $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$ respectivamente) (Fig. 7.8A). O mesmo perfil foi observado quando analisado o nível de fosforilação de ERK2 nas amostras de células HT22 tratadas durante 3, 6 ou 12 h com 50 μ M corticosterona ($F_{[5,18]} = 12,65$, $p < 0,001$; $p < 0,001$ e $p < 0,0001$ respectivamente) (Fig. 7.8B). Por outra parte, a análise estatística da razão fosfo-p38MAPK/total-p38MAPK das amostras de células HT22 revelou que a exposição durante 3 ou 6 h com 50 μ M corticosterona não alterou os níveis de fosforilação de p38MAPK ($F_{[5,18]} = 3,69$, $p > 0,05$). Contudo, um tratamento mais prolongado durante 12 h das células HT22 com 50 μ M corticosterona foi capaz de reduzir aproximadamente 40% os níveis de fosforilação de p38MAPK ($F_{[5,18]} = 3,69$, $p < 0,01$) (Fig. 7.8C).

Figura 7.8: Efeito da exposição de células HT22 à corticosterona sobre os níveis de fosforilação de Erk1/2 e p38MAPK



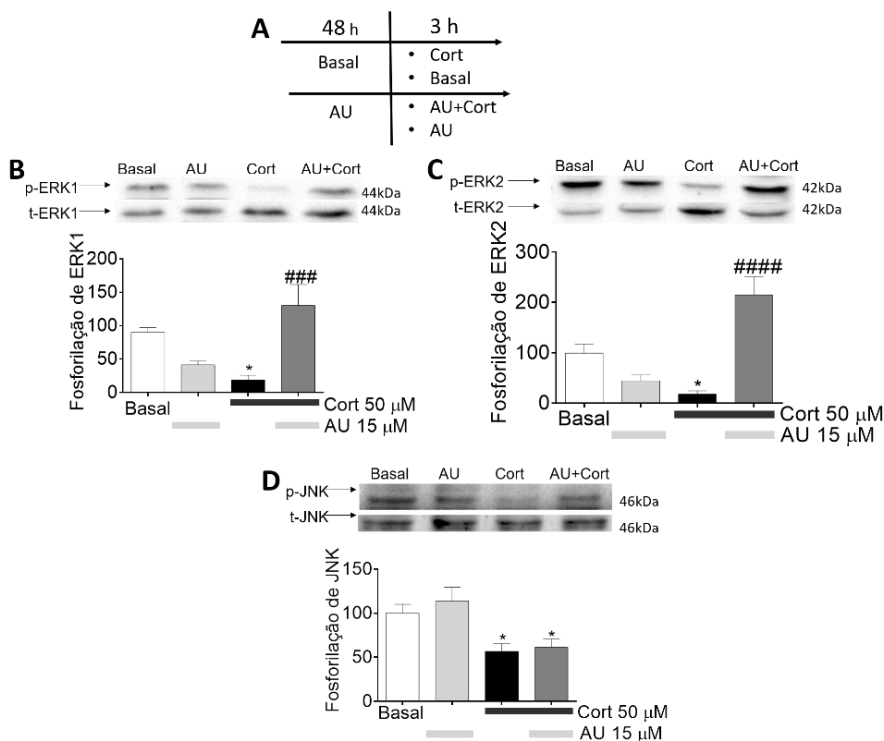
Homogenatos foram obtidos de células HT22 expostas durante 3, 6 ou 12 h com 50 μM corticosterona. A parte superior de cada figura ilustra os imunoblots representativos para as formas fosforiladas e totais de cada proteína. O histograma de colunas representa a semi-quantificação por densitometria ótica da razão da DO da forma fosforilada e da DO da forma total de ERK1 (painel A), ERK2 (painel B) e p38MAPK (painel C). Cada coluna representa a porcentagem em relação ao controle de 4 experimentos independentes (média + E.P.M., ANOVA de 1 via seguido do *posthoc* Newman Keuls). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle. Cort: corticosterona, p: fosforilada, t: total.

A partir deste ensaio, observamos alterações nos níveis de fosforilação de proteínas da via de sinalização MAPK a partir de 3 h de exposição das células HT22 a 50 μM corticosterona. Portanto, investigamos se a incubação prévia durante 48 h com 15 μM de AU junto com a co-incubação durante 3 h com 50 μM corticosterona era capaz de

prevenir a redução da fosforilação de proteínas cinase dependentes da sinalização MAPK induzidas pelo tratamento com corticosterona (Fig. 7.9A). A análise por DO de imunoblots incubadas com anticorpo específico para p-ERK1 revelou que o tratamento durante 48 h com 15 μM de AU preveniu a redução dos níveis de fosforilação de ERK1 induzido pela incubação com 50 μM corticosterona durante 3 h ($F_{[3,20]} = 8,92, p < 0,001$) (Fig. 7.9B). A redução da forma fosforilada de ERK2 induzido pela exposição de células HT22 durante 3 h a 50 μM corticosterona também foi prevenido pela pré-incubação das células durante 48 h com 15 μM AU junto a co-incubação durante 3 h com 50 μM corticosterona ($F_{[3,20]} = 17,26, p < 0,0001$) (Fig. 7.9C).

A análise da forma fosforilada e total de JNK (outra proteína cinase MAPK) permitiu revelar que os níveis de fosforilação de JNK estavam reduzidos em aproximadamente 60% nas células HT22 tratadas durante 3 h com 50 μM corticosterona ($F_{[3,20]} = 6,36, p < 0,05$). No entanto, a pré-incubação durante 48 h com 15 μM AU antes da co-incubação com 50 μM corticosterona não foi capaz de prevenir esta redução dos níveis de fosforilação de JNK ($F_{[3,20]} = 6,36, p < 0,05$) (Fig. 7.9D).

Figura 7.9: Avaliação dos níveis de fosforilação de Erk1/2 e JNK de células HT22 expostas a corticosterona ou AU

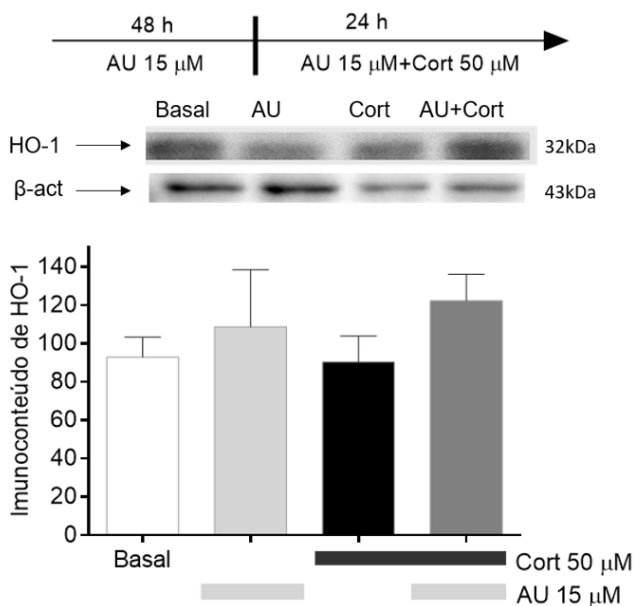


Protocolo experimental: Homogenatos foram obtidos de células HT22 expostas durante 3 h a 50 μM corticosterona, pré-incubadas durante 48 h com 15 μM AU e co-incubadas com 50 μM corticosterona durante 3 h ou incubadas durante 51 h com 15 μM AU (A). A parte superior de cada figura ilustra os imunoblots representativos para as formas fosforiladas e totais de cada proteína. O histograma de colunas representa a semi-quantificação por densitometria ótica da razão da DO da forma fosforilada e da DO da forma total de ERK1 (painel B), ERK2 (painel C) e JNK (painel D). Cada coluna representa a porcentagem em relação ao controle de 6 experimentos independentes (média + E.P.M., ANOVA de 1 via seguido do *posthoc* Newman Keuls). * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ em relação ao grupo tratado com corticosterona. AU: ácido ursólico, Cort: corticosterona, p: fosforilada, t: total.

Para investigar o efeito da exposição de células ao AU, à corticosterona ou pre-incubadas com AU e co-incubadas com

corticosterona sobre os níveis de HO-1, foi analisado o imunoc conteúdo desta enzima em células HT22 incubadas durante 24 h com 50 μM corticosterona, incubadas por 72 h com 15 μM AU ou incubadas por 48 h com 15 μM AU e co-incubadas com 50 μM corticosterona durante 24 h. A análise estatística da DO dos imunoblots revelou que o imunoc conteúdo de HO-1 foi similar em todas as condições experimentais ($F_{[3,12]} = 0,64$, $p > 0,05$) (Fig. 7.10).

Figura 7.10: Análise dos níveis de HO-1 de células HT22 expostas a corticosterona ou AU



Homogenatos foram obtidos de células HT22 expostas durante 48 h com 15 μM AU e co-incubadas durante 24 h com 50 μM corticosterona. A parte superior da figura ilustra os imunoblots representativos para HO-1 e β -actina. O histograma de colunas representa a semi-quantificação por densitometria ótica do imunoc conteúdo de HO-1 normalizado pela densidade de β -actina. Cada coluna representa a porcentagem em relação ao controle de 4 experimentos independentes (média + E.P.M., ANOVA de 1 via). AU: ácido ursólico, Cort: corticosterona, β -act: β -actina.

7.4 DISCUSSÃO

Uma das características fisiopatológicas já associada a alguns subtipos do TDM corresponde à observação, por meio de estudos de imagem e em tecidos *post-mortem* em pacientes, de uma diminuição do volume em algumas estruturas límbicas, principalmente no hipocampo (SHELIN *et al.*, 1996; SHELIN *et al.*, 1999; BREMNER *et al.*, 2000; MACQUEEN *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2004; MCKINNON *et al.*, 2009; ARNONE *et al.*, 2013) (Ver Seção 1.3.2). Adicionalmente, diversos estudos evidenciaram que, roedores submetidos a modelos de distresse expressam um comportamento tipo-depressivo associado a uma atrofia neuronal e redução na densidade sináptica hipocampal (CZÉH *et al.*, 2001; DUMAN e LI, 2012) (Ver Seção 1.3.3). Estes dados permitiram associar a atrofia neuronal no hipocampo com eventos de distresse, hiperativação e perda do sistema de retroalimentação negativo do eixo HPA em pacientes que são acometidos por TDM (BREMNER *et al.*, 1995; GILBERTSON *et al.*, 2002; VYTHILINGAM *et al.*, 2002) e em roedores submetidos a modelos de distresse (UNO *et al.*, 1994; CZÉH *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2001; LUCASSEN *et al.*, 2001; KRISHNAN e NESTLER, 2011; MORETTI *et al.*, 2012). Já em estudos *in vitro* por exemplo, uma exposição prolongada de neurônios hipocampais a glicocorticóides parece reproduzir os mesmos efeitos do estresse crônico no hipocampo (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; KOSTEN *et al.*, 2008) (Ver Seção 1.3.3). Ainda, destaca-se que a administração de fármacos de ação antidepressiva em roedores e em pacientes parece atuar de maneira protetora frente a este insulto (VINET *et al.*, 2004; PITTENGER e DUMAN, 2008; BRAVO *et al.*, 2009; MORETTI *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2016) (Ver Seção 1.3.3).

Contudo, novas estratégias que considerem antidepressivos com características neuroprotetoras se fazem necessárias para o tratamento do TDM. Nesse sentido, o AU constitui um composto promissor sendo que estudos prévios têm demonstrado que este composto apresenta um efeito tipo-antidepressivo e anti-estresse em modelos animais e *in vitro*, além de um potencial neuroprotetor frente a diversos insultos. Entretanto, até o momento não tinha sido investigado o potencial neuroprotetor do AU frente a um insulto *in vitro* com corticosterona.

No presente trabalho investigamos um modelo de citotoxicidade que mimetiza o efeito da hipersecreção de glicocorticóides mediante a incubação de células HT22 com corticosterona e demonstramos pela primeira vez que o AU exerce efeitos citoprotetores frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona em células da linhagem HT22, uma linhagem de origem hipocampal de camundongos. No nosso modelo de estudo, a incubação durante 48 h de células HT22 com baixas concentrações de AU (5 ou 15 μM) foi capaz de prevenir a redução da viabilidade destas células, além de prevenir o aumento de células positivas para IP, o aumento de apoptose e do aumento da formação de vesículas indicadoras de autofagia induzidos pela exposição destas células à corticosterona. Nesse sentido, diversos autores já reportaram efeitos neuroprotetores dos compostos triterpenóides como o CDDO-MA, a piperina, o ácido asiático e o ácido tormentico frente a insultos neurotóxicos incluindo o MPTP, ácido 3-nitropropiónico e os peptídeos $\text{A}\beta$ (YANG *et al.*, 2009; MAO *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2016). Nossos achados sugerem, portanto, que a família de triterpenóides parece compartilhar propriedades neuroprotetoras.

Um detalhe importante do nosso trabalho reside no fato de ter escolhido uma linhagem de células hipocampais, uma vez que o

hipocampo é uma das principais reguladoras do humor e constitui uma das regiões mais afetadas pelos hormônios associados ao distresse em função da alta densidade de GR neste tecido. Apesar de que a linhagem HT22 não expressa receptores de glutamato nem possui características funcionais de neurônio colinérgico (MAHER e DAVIS, 1996; LIU *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2013), esta linhagem sim expressa receptores de dopamina (ISHIGE *et al.*, 2001; LUEDTKE *et al.*, 2012) e GR (BEHL *et al.*, 1997), MAO-A e MAO-B (MAHER e DAVIS, 1996). Behl e col. (1997) demonstraram que as células HT22 são sensíveis ao estímulo com glicocorticóides, o que faz destas um excelente modelo para estudar a morte celular induzida por glicocorticóides (BEHL *et al.*, 1997). Assim, nossos resultados reforçam os achados por outros autores que utilizaram este mesmo modelo de citotoxicidade em células HT22 induzido pela incubação com corticosterona (BEHL *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2015). Em particular, uma diferença do trabalho de Freitas e col. (2014) em relação ao nosso reside no fato de que o primeiro utilizou 100 μM de corticosterona para promover o dano celular, enquanto que no nosso estudo verificamos que já com 50 μM de corticosterona pode ser induzida a morte de células HT22 (FREITAS *et al.*, 2015). Os nossos resultados ainda estão de acordo com outros estudos prévios, os quais demonstraram que 50 μM de corticosterona também reduziu a viabilidade celular somente após 24 h de incubação nas células HT22 (XU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013).

O ensaio de dupla marcação para IP/Hoechst permitiu também observar que o tratamento com 50 μM de corticosterona aumentou aproximadamente 8 vezes a quantidade de células mortas ou com sinais de necrose se comparado com a condição controle. Este dado sugere que o efeito citotóxico da corticosterona possivelmente envolve, pelo menos

em parte, processos de necrose em um pequeno número de células. A necrose pode ocorrer tardiamente (POON *et al.*, 2010) e muitas vezes dentro de um cenário de distúrbio celular que envolve processos inflamatórios (YAKOVLEV e FADEN, 2004). Portanto, na maioria das células, é provável que o efeito citotóxico da corticosterona seja causado por outro processo de morte, como a apoptose. Nesse sentido e reforçando esta hipótese, Freitas e col. (2015) demonstraram que 30% das células HT22 tratadas com 100 μM de corticosterona estavam em processo de apoptose (FREITAS *et al.*, 2015). De acordo com estes dados, no nosso trabalho detectamos que a corticosterona é capaz de promover a apoptose de células HT22. Entretanto, a diferença do trabalho de Freitas e col. (2015), o nosso estudo revelou que aproximadamente um 15% das células HT22 estavam em apoptose, uma discrepância que pode ser resultado da exposição das células a uma menor concentração de corticosterona (50 μM). Outro tipo de modelo *ex vivo* também demonstrou que a incubação com corticosterona promove a morte celular por apoptose em fatias de hipocampo de ratos (KUREK *et al.*, 2016). Esta morte celular foi mais acentuada inclusive nas fatias de hipocampo de ratos submetidos a um modelo de estresse pré-natal (KUREK *et al.*, 2016). Portanto, estes dados reforçam a hipótese de que a exposição de células hipocâmpais com corticosterona pode levar as células à morte, principalmente por apoptose.

Assim como relatado por outros autores, nossos resultados confirmam que os efeitos citotóxicos da corticosterona podem ser abolidos pelo antagonista RU486 (BEHL, TRAPP, *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2015). Este esteroide antagoniza a ligação da corticosterona com GR de maneira competitiva (GALLAGHER e YOUNG, 2006). Portanto, estes dados sugerem que a morte celular induzida pela corticosterona possa ser mediada pela ativação de GR. Vale mencionar que, este

antagonista já tem demonstrado habilidade em reduzir o dano oxidativo em modelos *in vitro* induzidos em células HT22 pela excitotoxicidade induzida pelo glutamato e peptídeos A β (BEHL *et al.*, 1997). Ainda, este esteroide é utilizado na clínica para melhorar os sintomas de psicose associados ao TDM (GALLAGHER e YOUNG, 2006). Devido ao fato de serem necessárias 24 h para se observar uma diminuição da viabilidade celular no nosso modelo, nós inferimos que outros mecanismos também possam ser responsáveis pela morte de células HT22 induzida pela corticosterona. Por um lado, é possível que os efeitos citotóxicos de corticosterona dependam em parte de mecanismos genômicos, gerados pela ativação dos GR e a sua translocação para o núcleo, onde este liga-se aos GREs para transativar ou transreprimir a transcrição de genes responsáveis pela morte celular, como a *caspase 8* e os genes da família da Bcl-2 (SCHMIDT *et al.*, 2004). Ainda, considerando o recente trabalho de Hélène e col. (2016), podemos especular que um dos efeitos citotóxicos da corticosterona poderia estar relacionado com uma alteração da remodelação do citoesqueleto de actina da célula, visto que foi demonstrado que a incubação de células HT22 durante 4 dias com 1 μ M de dexametasona (corticoide sintético e agonista de GR e MR) afeta a estrutura do citoesqueleto, o que por consequência, pode influenciar na sinalização intracelular e reduzir a sobrevivência destas células (HÉLÈNE *et al.*, 2016).

Apesar de que no nosso trabalho não investigamos o papel do AU sobre o GR, alguns estudos prévios têm sugerido um possível efeito do AU sobre a atividade de GR (CHA *et al.*, 1998; YAROSH *et al.*, 2000; MORTIBOYS *et al.*, 2013). Por exemplo, já foi sugerido que a molécula de AU possui uma estrutura química similar com a família dos estradióis, os quais compartilham a característica de serem ligantes de receptores

nucleares para glicocorticóides (CHA *et al.*, 1998; YAROSH *et al.*, 2000; MORTIBOYS *et al.*, 2013). De fato, a merotaina (também conhecida como URA, um AU incorporado em lipossomas) parece competir com RU486 na ligação com GR e atua regulando a expressão de metaloproteinases de matriz extracelular dependentes da ativação de GR (CHA *et al.*, 1998). Além disso, assim como observado com outros ligantes de GR, URA têm a capacidade de se ligar a GR e de estimular a produção de colágeno ou suprimir a expressão gênica de queratina e ceramida nos queratinócitos (YAROSH *et al.*, 2000). Por tanto, em base a estes estudos podemos especular que o efeito citoprotetor do AU frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona possa ser mediado, pelo menos em parte, por uma modulação direta sobre a atividade do GR, entretanto, serão necessários maiores estudos para verificar esta hipótese.

Um dos principais achados do nosso trabalho foi a observação de que o AU preveniu a redução da viabilidade celular induzida pela corticosterona. No nosso estudo observamos que somente após 48 h e não 24 h de exposição, o AU exerceu um efeito citoprotetor. Este tempo maior de incubação sugere que o AU atue modulando vias de sinalização intracelulares e promova a transcrição de genes relacionados com a sobrevivência e a produção de fatores neurotróficos. Nesse sentido, tem sido demonstrado que o AU é capaz de proteger células PC12 da citotoxicidade induzida pelo β -amiloide na mesma faixa de concentração e com o mesmo tempo de incubação observados no presente trabalho (HEO *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2012).

Confirmando os achados no ensaio de MTT, no nosso trabalho observamos que o AU foi capaz de prevenir o aumento do número de células marcadas com IP e a percentagem de células em apoptose. Em concordância com estes resultados, Shih e col. (2004), demonstraram que

o AU protegeu os neurônios de culturas primárias de hipocampo de ratos da morte por necrose induzida pelo KA na mesma faixa de concentração testada no nosso trabalho (10 e 15 μM) (SHIH *et al.*, 2004). Entretanto, à diferença do nosso estudo que observamos efeitos citoprotetores após 48 h, Shih e col. (2004) detectaram que o efeito neuroprotetor frente à excitotoxicidade induzida pelo KA foi observado após uma incubação de menor tempo (10 min) dos neurônios com o AU. Esta diferença nos tempos de incubação pode ser devida a uma maior sensibilidade dos neurônios derivados de uma cultura primária considerando que, à diferença dos neurônios, as células HT22 são células imortalizadas e não expressam a maioria das proteínas e receptores de um neurônio hipocampal. Alguns trabalhos que mostraram previamente que o efeito protetor de antidepressivos clássicos parece envolver a modulação de morte por necrose (ZHANG *et al.*, 2008; ONO *et al.*, 2012). Nesse sentido, o trabalho de Ono e col. (2012) reportou efeitos neuroprotetores e uma redução no número de células necróticas em células HT22 incubadas com imipramina frente a um dano induzido por tunicamicina (ONO *et al.*, 2012). Já, Zhang e col. (2008) relataram que a nortriptilina protegeu os neurônios corticais primários da morte celular induzida pela privação de oxigênio e glicose (um modelo *in vitro* de isquemia cerebral), em parte inibindo o processo de necrose (ZHANG *et al.*, 2008).

Em conjunto, as evidências apresentadas no nosso trabalho permitem inferir que uma parte dos efeitos neuroprotetores do AU no modelo *in vitro* de citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22 pode ser devida, em parte, a uma regulação nos mecanismos de apoptose. Nesse sentido um trabalho prévio de nosso grupo (COLLA, 2015), reportou que a administração crônica de camundongos durante 7 dias com AU preveniu o aumento da expressão da proteína pró-apoptótica

bax e aumentou a razão da expressão proteínas anti versus pró-apoptóticas (*bcl2/bax*) no hipocampo de camundongos submetidos a um protocolo de ECI (COLLA, 2015). Em base a estes dados, especulamos que o efeito citoprotetor do AU em células HT22 frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona restabeleça, em parte, os níveis de proteínas pró-apoptóticas vs anti-apoptóticas, uma hipótese que deve ser avaliada em futuros estudos.

Adicionalmente, não podemos descartar a possibilidade de que outros mecanismos de morte celular estejam envolvidos na citotoxicidade da corticosterona sendo que a morte neuronal também pode exibir características de autofagia, necroptose e até mesmo apoptose independente de caspases, entre outros (REAGAN e MCEWEN, 1997; YAKOVLEV e FADEN, 2004; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013). Em particular, a autofagia é considerada como um mecanismo de homeostase celular ativado sobre condições celulares normais e fisiológicas (LI *et al.*, 2014). Entretanto, existem reportes na literatura de que o excesso de autofagia pode levar a morte celular em processos neurodegenerativos (CHERRA e CHU, 2008) e também poderia estar presente no dano hipocampal associado ao TDM (JIA e LE, 2015). Nesse sentido, já foi demonstrado que eventos de distresse podem estar associados com um aumento de proteínas envolvidas na autofagia no hipocampo de ratos (HOU *et al.*, 2015) e de camundongos (QU *et al.*, 2017). Inclusive, um recente estudo demonstrou que a exposição de neurônios derivados de uma cultura primária de hipocampos a peptídeos A β ou a corticosterona foi capaz de promover a morte por apoptose e de estimular a expressão de proteínas envolvidas na autofagia nestes neurônios (WUWONGSE *et al.*, 2013). De fato, a incubação de neurônios com antidepressivos foi capaz de prevenir este dano celular induzido pela corticosterona (WUWONGSE

et al., 2013). De acordo com estes achados, no nosso trabalho a incubação de células HT22 com corticosterona foi capaz de aumentar a presença de vesículas ácidas em algumas células, um indicador do aumento da formação de autolisossomas tardios (Fig. 7.11), que sugere um aumento da autofagia em estas condições experimentais (KLIONSKY *et al.*, 2016). Mais interessante ainda, o tratamento com AU preveniu este aumento, o que sugere que o efeito citoprotetor do AU frente à corticosterona esteja mediado, pelo menos em parte, da inibição de mecanismos de autofagia nas células HT22. Em contraste com o observado com o AU, outros compostos de ação antidepressiva como a venlafaxina não afetam os processos de autofagia e, diversos outros compostos como a amitriptilina, a paroxetina e o citalopram parecem até estimular este processo celular dependendo das condições experimentais (ZSCHOCKE *et al.*, 2011; GASSEN *et al.*, 2014). Finalmente, deve-se notar que a metodologia empregada no nosso trabalho para investigar a autofagia possui a limitação de detectar unicamente a formação de vesículas ácidas ou de autolisossomos, que correspondem a uma fase mais tardia da autofagia (KLIONSKY *et al.*, 2016). Portanto, a análise mediante a coração com laranja de acridina deve ser acompanhada de uma análise de expressão de proteínas envolvidas neste mecanismo celular para poder confirmar a presença de células em outras etapas de autofagia. Assim, maiores estudos devem ser encaminhados no futuro a fim de investigar a participação da autofagia no efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona.

Como resposta à corticosterona, alguns estudos já evidenciaram a possibilidade de um sinergismo entre diversos processos celulares que pode envolver, em parte, a modulação do estado de fosforilação e a atividade de proteínas cinases (MAIYAR *et al.*, 1997), principalmente

daquelas que participam nas cascatas de sinalização celular de sobrevivência celular (DAVID e KALB, 2005; LANG e STOURNARAS, 2013). Entre estas proteínas cinase destacamos as vias de sinalização dependentes de PI3K/Akt, PKA, CaMKII, e PKC, as quais são elementos chave da transdução de sinais envolvidas na proliferação, diferenciação e resposta ao estresse celular. No nosso trabalho observamos que a exposição a uma concentração de LY294002 que não altera a viabilidade de células HT22 não preveniu o efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona nas células HT22. Este dado sugere que a via de sinalização dependente da ativação de PI3K não está envolvida no efeito citoprotetor do AU. Em contraste, a exposição prévia das células HT22 a H-89, KN-62 ou queleritrina, preveniu o efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona. Estes dados, portanto, parecem indicar que a ativação de PKA, PKC e CaMKII pode estar envolvida, pelo menos em parte, no mecanismo citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona. Um detalhe interessante do nosso trabalho permitiu revelar que a incubação das células HT22 unicamente com H-89 resultou num aumento da viabilidade celular. Este dado nos permite inferir que a inibição de PKA durante um tempo prolongado pode estimular, em parte, a proliferação de células HT22. De fato, um estudo tem sugerido que H-89 parece promover, por exemplo, a sobrevivência e a clonogenicidade de células tronco embrionárias (ZHANG *et al.*, 2016). Inclusive já foi descrito que, além de atuar sobre a atividade da PKA, H-89 parece inibir também outras proteínas cinases que possuem um sítio de ligação ao ATP (LOCHNER e MOOLMAN, 2006). Portanto, neste caso o efeito estimulador de H-89 sobre a viabilidade de células HT22 poderia ser resultado de um mecanismo compensatório.

Assim como PKA, PKC e CaMKII, vias de sinalização dependentes de MAPKs, como ERK, JNK e p38MAPK, estão envolvidas na resposta ao estresse celular podendo ativar fatores de transcrição e promovendo a proliferação e a resposta inflamatória. Por uma parte, a via de sinalização dependente da ativação de ERK pode estimular a produção de fatores neurotróficos e promover a neuroproteção em células HT22 (RÖSSLER *et al.*, 2004). No nosso estudo detectamos que, a incubação de células HT22 com corticosterona durante 3, 6 ou 12 h foi suficiente para reduzir significativamente os níveis de fosforilação de ERK1/2. Este dado nos sugere que a corticosterona pode inibir, em parte, a ativação de ERK1/2. Os nossos achados são contrários a alguns achados na literatura onde a corticosterona parece induzir um aumento transitório da atividade e da fosforilação de ERK em células HT22, talvez como um mecanismo inicial em resposta ao estresse celular (ZHOU *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2013). Esta discrepância entre os trabalhos pode ser explicada em parte considerando que, no nosso estudo investigamos a forma fosforilada *vs* a total de ERK1/2 após 3, 6 ou 12 h, sendo que outros trabalhos demonstraram que, a corticosterona parece induzir um aumento transitório da fosforilação desta proteína em tempos menores a 3 h em células HT22 (ZHOU *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2013). Por outra parte, outros estudos reforçam os nossos achados sendo que o nível de fosforilação de ERK também foi reduzido drasticamente em células HT22 incubadas durante 4 h (XU *et al.*, 2013) e em células PC12 incubadas durante 24 h (ZOU *et al.*, 2016) com corticosterona.

A ativação de p38MAPK também parece estar relacionado com o estresse celular e a presença de citocinas, e pode ser ativado frente a um insulto como a excitotoxicidade induzida pelo glutamato em neurônios hipocámpais (MOLZ *et al.*, 2008). No nosso trabalho observamos que a

incubação mais prolongada de células HT22 durante 12 h com corticosterona induziu uma redução dos níveis de fosforilação de p38MAPK, o que pode indicar uma possível inibição da corticosterona sobre a atividade de p38MAPK ou vice-versa. De acordo com os nossos achados, um estudo demonstrou que a atividade de p38MAPK está reduzida no córtex pré-frontal de ratos submetidos a um protocolo de estresse pré-natal (BUDZISZEWSKA *et al.*, 2010). Inclusive, células fibroblastos embrionários de camundongos deficientes para p38MAPK parecem ser mais suscetíveis a um insulto citotóxico com H₂O₂ e à morte celular (GUTIÉRREZ-UZQUIZA *et al.*, 2012). Diferentemente destes e do nosso estudo, um trabalho demonstrou que a corticosterona parece induzir um rápido aumento dos níveis de fosforilação de p38MAPK e JNK em células PC12 (LI *et al.*, 2001).

A ativação de JNK pode estar relacionada tanto com mecanismos de sobrevivência celular quanto na ativação de funções apoptóticas dependendo do estímulo, da duração do estímulo e da atividade de outras vias de sinalização (LIU e LIN, 2005). Nesse sentido, no nosso trabalho detectamos uma redução dos níveis de fosforilação de JNK nas células HT22 incubadas durante 3 h com corticosterona. De acordo com os nossos achados, um estudo observou o mesmo efeito dos glicocorticóides sobre as células HT22, sendo que o SP-600125 (um inibidor de JNK) causou a indução de GR e acentuou o efeito da dexametasona (um glicocorticóide sintético) em estas células (WANG *et al.*, 2005). Uma explicação plausível a estas observações pode ser derivada do fato de que a função de GR e a resposta aos glicocorticóides parece estar mediada, pelo menos em parte, negativamente por diferentes vias de sinalização dependentes de MAPKs. Por tanto, a ativação de ERK ou JNK pode inibir diretamente a função de GR (PACE *et al.*, 2007).

Um achado interessante no nosso estudo foi notar também que a redução dos níveis de fosforilação de ERK1/2 induzido pela corticosterona foi prevenido pela incubação com AU nas células HT22. Este dado sugere que a ativação de ERK1/2 pode mediar, pelo menos em parte o efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona (PACE *et al.*, 2007). De acordo com os nossos achados, outros estudos têm sugerido que a ativação de ERK pode atuar como protetora de células frente a morte por privação de glicose como observado nas células HT22, e pode ativar CREB que em consequência promove a expressão de BDNF (RÖSSLER *et al.*, 2004). Inclusive, outros fármacos de ação antidepressiva estimulam a fosforilação de ERK1/2, como a fluoxetina nos astrócitos (MERCIER *et al.*, 2004) e a imipramina, que aumentou a fosforilação de ERK1/2 no hipocampo de camundongos submetidos a um protocolo de estresse (LEEM *et al.*, 2014). De fato, foi demonstrado que o efeito citoprotetor da apelin-13 frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22 parece ser mediado, em parte, pela ativação de vias de sinalização dependentes de ERK (ZOU *et al.*, 2016).

Em comparação com o efeito do AU sobre o nível de ERK1/2, no nosso estudo o AU não foi capaz de prevenir a redução dos níveis de fosforilação de JNK nas células HT22 incubadas com corticosterona. Uma explicação plausível para este fenômeno pode ser devido a que a ativação de ERK1/2 mediada pelo AU tenha também atuado sobre a atividade de JNK. Esta hipótese se deriva do fato de que a ativação de ERK suprime a atividade pró-apoptótica de JNK e p38MAPK, mediante este mecanismo as células PC12 foram protegidas da deficiência do fator de crescimento nervoso e da morte celular (XIA *et al.*, 1995). Apesar de não ser estatisticamente significativo, no nosso estudo notamos que a

incubação das células HT22 unicamente com AU pareceu também reduzir os níveis de fosforilação de ERK1/2. Este efeito poderia ser compensatório, considerando que alguns estudos sugerem que em algumas condições experimentais a ativação prolongada de ERK também pode promover efeitos citotóxicos (SUBRAMANIAM e UNSICKER, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado que a capacidade do AU de incrementar a expressão e o nível da enzima HO-1 pode mediar seus efeito neuroprotetores frente à isquemia (LI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016) e o traumatismo encefálico (DING *et al.*, 2017). Outros efeitos do AU parecem também depender da modulação de HO-1, sendo que a ação antitumoral do AU em células Kasumi-1 (de leucemia mieloide) parece depender da inibição da HO-1 (MA *et al.*, 2014). A diferença destes trabalhos, no nosso estudo não observamos uma possível indução de HO-1 mediada pelo AU frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona. Esta discrepância pode ser explicada em parte considerando que no nosso trabalho investigamos o imunoconteúdo de HO-1 unicamente no ponto final da co-incubação com corticosterona e AU. Portanto, serão necessários estudos mais aprofundados para conhecer o papel de HO-1 no efeito neuroprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona nas células HT22.

Um dos resultados mais intrigantes do nosso trabalho foi a observação de um efeito dual do AU em relação a viabilidade celular, uma vez que concentrações baixas (5 ou 15 μM) de AU não alteraram a viabilidade e inclusive atuaram como neuroprotetoras no nosso modelo, enquanto que concentrações altas (50 μM) de AU reduziram a viabilidade. Vale mencionar que, um perfil similar de resposta citoprotetora e citotóxica bem próximas já foi relatada para o AU, o qual

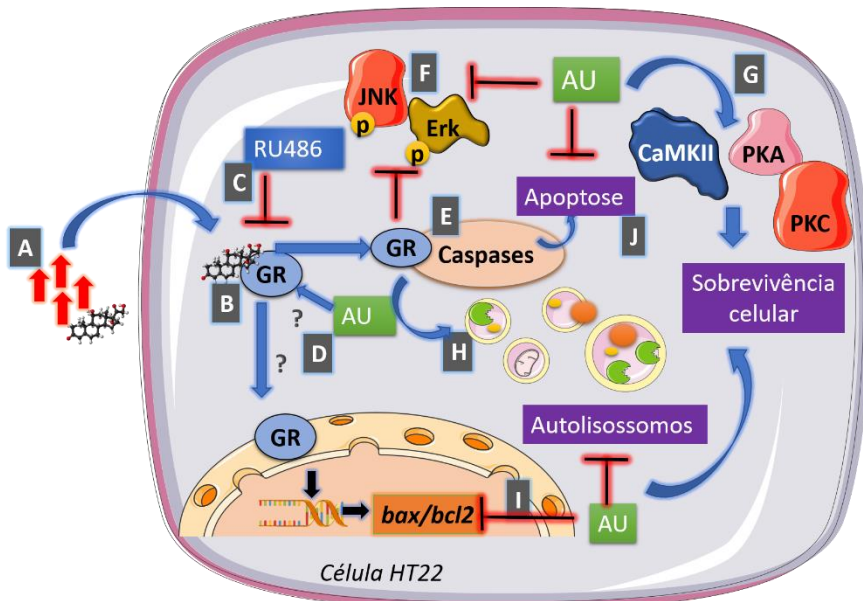
apresentou efeitos antioxidantes até 10 μM e citotóxicos a partir de 20 μM em células leucêmicas de roedor (OVESNÁ *et al.*, 2006). Outros compostos fitoquímicos, como a curcumina e o ácido caféico, também apresentam uma faixa de atividade bastante próximas, onde concentrações até 30 μM exercem efeitos citoprotetores e, concentrações maiores a partir de 50 μM induzem a morte celular (SCAPAGNINI *et al.*, 2002). Estudos com células tumorais também demonstraram que AU exerce efeitos citotóxicos e antitumorais (SHANMUGAM *et al.*, 2013). Em células de glioblastoma multiforme DBTRG-05MG, o AU na concentração de 15 μM não altera a viabilidade celular, entanto que a partir de 20 μM já é possível notar uma redução na viabilidade destas células, aumentando a produção de espécies reativas e induzindo processos de morte celular por necrose (LU *et al.*, 2014). Ainda, a literatura tem relatado resultados experimentais contrastantes em relação aos efeitos do AU, os quais podem ser antioxidantes, anti-inflamatórios e protetores ou pró-oxidantes e citotóxicos, dependendo do tecido, do tipo celular e das condições experimentais (LIBY *et al.*, 2007; TANNOCK, 2011). Finalmente, alguns autores sugerem que o AU, assim como outros compostos triterpenóides, atuem de maneira bifásica dependendo da concentração e das condições experimentais (LIBY *et al.*, 2007; IKEDA *et al.*, 2008).

Deve ser destacado também que, apesar da maioria dos estudos demonstrarem que antidepressivos clássicos exercem efeitos neuroprotetores em concentrações que vão desde 0,1 a 10 μM , uma busca mais exaustiva na literatura nos permitiu descobrir que estes fármacos também apresentam efeitos citotóxicos de maneira concentração-dependente (CHEN *et al.*, 2007; FREITAS *et al.*, 2015; POST *et al.*, 2011; SCHAZ *et al.*, 2011). Por exemplo, a fluoxetina parece exercer

efeitos neuroprotetores quando incubada partir de 0,1 μM em células HT22 (FREITAS *et al.*, 2015) e, uma concentração maior de até 20 μM de fluoxetina, estimula a proliferação em células tronco adultas de hipocampo (CHEN *et al.*, 2007). No entanto, efeitos neurotóxicos parecem começar a ser observados já a partir da incubação de neurônios corticais e hipocampais com 2,5 μM de fluoxetina (SCHAZ *et al.*, 2011) ou após a incubação de células HT22 com 20 μM de fluoxetina (POST *et al.*, 2000). Portanto, se consideramos que, a faixa de concentrações em pacientes depressivos tratados com fluoxetina pode atingir entre 14 a 25 μM no plasma (HENRY *et al.*, 2005) e até 10,7 $\mu\text{g/ml}$ no cérebro dos pacientes (KARSON *et al.*, 1993), se fazem necessários maiores estudos para avaliar até que ponto os fármacos com atividade antidepressiva podem causar efeitos citotóxicos.

Finalmente, considerando que a morte neuronal pode ocorrer mediante diversos mecanismos (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013) e, tendo em conta que estes mecanismos compartilham muitas vias de sinalização intracelulares (NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013), a investigação de compostos com atividade antidepressiva que exerçam a neuroproteção mediante diferentes mecanismos torna-se especialmente relevante (YAKOVLEV e FADEN, 2004). Nesse sentido, o fato de que o AU seja capaz de prevenir diversos mecanismos de morte neuronal e atua através de diferentes vias de sinalização intracelulares, torna este composto mais interessante para o tratamento de doenças associadas a processos neurodegenerativos e o TDM.

Figura 7.11: Mecanismo citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22



A incubação de células HT22 com 50 μM corticosterona (A) durante 24 h ativa GR (B) e desencadeia mecanismos de morte celular relacionados, em parte, com a apoptose e autofagia. 2,5 μM RU486 é capaz de inibir a ativação de GR (C). Não se sabe ainda se o AU modula a atividade de GR (D). A corticosterona induz mecanismos de morte por apoptose, o qual foi prevenido pelo AU (E). A corticosterona reduz os níveis de fosforilação de JNK e ERK1/2 após 3 h de incubação em células HT22. O AU foi capaz de prevenir unicamente a redução dos níveis de fosforilação de ERK1/2 (F). O efeito neuroprotetor do AU está mediado, pelo menos em parte, da ativação de PKA, PKC e CaMKII (G). Além disso, o AU foi capaz de prevenir o aumento da formação de autolisossomos sugestivos de processos de autofagia induzidos pela corticosterona (H). Estudos prévios realizados em camundongos demonstraram que a administração crônica dos animais com AU (0,1 mg/kg, p.o.) além de prevenir o fenótipo tipo-depressivo dos animais, foi capaz de equilibrar os níveis de RNAm de proteínas pró vs anti-apoptóticas no hipocampo destes animais, o que sugere que no nosso

modelo o AU também esteja atuando mediante este mecanismo (I). Em conjunto, o AU foi capaz de ativar vias de sinalização relacionadas com a proliferação e de inibir a apoptose e morte celular por autofagia induzidos pela corticosterona, o que promoveu a sobrevivência das células HT22. *Abreviaturas: ácido ursólico, AU; proteína X associada à Bcl-2, bax; Proteína 2 de linfoma de células B, bcl-2; proteína cinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina II, CaMKII; proteína cinase c-Jun NH₂-terminal, JNK; proteína cinase regulada por sinal extracelular, ERK; proteína cinase A, PKA; proteína cinase C, PKC; receptor de glicocorticoide, GR.* Fonte: Autor. A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Servier Medical Art” (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>)

8. DISCUSSÃO GERAL

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram pela primeira vez os efeitos tipo-antidepressivos do AU em camundongos submetidos a diversos modelos preditivos ou indutores do fenotipo tipo-depressivo como o ECI e a administração crônica de corticosterona. Estes efeitos parecem estar mediados, pelo menos em parte, da ativação e modulação da neurotransmissão serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica (MACHADO *et al.*, 2012; COLLA *et al.*, 2014). A partir destas evidências, nos questionamos inicialmente quais seriam as vias intracelulares de sinalização que participam do efeito tipo-antidepressivo do AU em camundongos.

A literatura reporta que o mecanismo de ação dos compostos antidepressivos pode estar associado com a modulação de vias de sinalização intracelulares relacionadas com a neuroplasticidade e a sobrevivência de neurônios. Estes mecanismos seriam responsáveis, em parte, dos efeitos adaptativos que desencadeiam os fármacos antidepressivos na remissão de sintomas (POPOLI *et al.*, 2000; NICIU *et al.*, 2013). Entre os componentes que participam destas vias de transdução de sinais, destacamos principalmente o papel das proteínas cinases como a PKC, PKA, CaMKII, MEK/ERK1/2 e PI3K na fisiopatologia do TDM e nos mecanismos envolvidos na resposta aos antidepressivos (POPOLI *et al.*, 2000). Assim, diversos estudos já vêm reforçando esta hipótese e demonstraram a contribuição da atividade de PKC, PKA, CaMKII, MEK/ERK1/2 e PI3K, por exemplo, no efeito tipo-antidepressivo do zinco (MANOSSO, MORETTI, RIBEIRO, *et al.*, 2015), do ácido ferúlico (ZENI *et al.*, 2012) e da creatina (CUNHA *et al.*, 2014). De acordo com

estas evidências, o nosso trabalho demonstra pela primeira vez que o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC em camundongos parece estar mediado, pelo menos em parte, pela ativação de PKC, PKA, CaMKII, MEK/ERK1/2. Em contraste com observado com compostos de ação tipo-antidepressiva rápida como a creatina, o zinco e o ácido fólico, o efeito anti-imobilidade do AU não requer da ativação de PI3K (BUDNI, LOBATO, BINFARÉ, *et al.*, 2012; MANOSSO, MORETTI, RIBEIRO, *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2016; PAZINI *et al.*, 2016).

O nosso estudo não permitiu evidenciar o papel de DARPP-32 no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC em camundongos sendo que o nível desta enzima estava reduzido, entretanto a taxa de fosforilação do resíduo Thr⁷⁵ de DARPP-32 foi similar no hipocampo de camundongos tratados com AU ou veículo. Uma limitação do nosso trabalho do Capítulo I está relacionada com a ausência de estudos bioquímicos que verifiquem a inibição das proteínas cinases mencionadas anteriormente no cérebro dos camundongos. Apesar deste fato, devemos destacar a eficiência (ALMEIDA *et al.*, 2006; BUDNI, LOBATO, BINFARE, *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014; RIEGER *et al.*, 2014; MANOSSO, MORETTI, RIBEIRO, *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2016; GONCALVES *et al.*, 2016; PINTO BROD *et al.*, 2017) e a seletividade (HERBERT *et al.*, 1990; DUDLEY *et al.*, 1995; FAVATA *et al.*, 1998; DAVIES *et al.*, 2000; MURRAY, 2008) destes inibidores farmacológicos em prevenir a ação tipo-antidepressiva de diversos agentes. Além disso, de acordo com estudos prévios que utilizaram as mesmas doses, a administração i.c.v. destes inibidores não alterou a atividade locomotora dos animais (ALMEIDA *et al.*, 2006; BUDNI, LOBATO, BINFARE, *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014; RIEGER *et al.*, 2014; MANOSSO, MORETTI,

RIBEIRO, *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2016; GONCALVES *et al.*, 2016; PINTO BROAD *et al.*, 2017), o que nos permite descartar possíveis efeitos inespecíficos no TSC.

O nosso trabalho também demonstrou que a indução de HO-1 é requerida, pelo menos em parte, pelo AU para exercer um efeito tipo-antidepressivo no TSC. A literatura sugere que, a ativação de HO-1 poderia ser mediada em parte, pela ativação de PKC e MEK/ERK1/2, um dado interessante considerando que o AU parece também necessitar da ativação destas proteínas cinases para exercer um efeito tipo-antidepressivo. A ativação e indução de HO-1 parece estar envolvida em outros efeitos neuroprotetores do AU (LI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016). Assim como observado com o AU, diversos compostos de ação tipo-antidepressiva em camundongos parecem modular a atividade de HO-1 (BETTIO *et al.*, 2014; MORETTI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2016; FREITAS *et al.*, 2016).

Dados na literatura têm indicado que a ativação de PKA, PKC, MEK/ERK1/2, CaMKII e HO-1 podem convergir na ativação de CREB (POPOLI *et al.*, 2000; KRÖNKE *et al.*, 2003; DI BENEDETTO *et al.*, 2007), um fator de transcrição que modula, entre outros, a expressão e a produção de neurotrofinas (FIENBERG e GREENGARD, 2000; POPOLI *et al.*, 2000; QI *et al.*, 2014). Assim, o aumento de fatores neurotróficos já foi correlacionado com mecanismos de proliferação e sobrevivência celular. De fato, a ação de diversos compostos antidepressivos parece envolver estas vias de sinalização celular (SCHMIDT *et al.*, 2008) e promover efeitos neuroprotetores frente a disfunção neurotrófica e a neurotoxicidade presente em tecidos como hipocampo de pacientes com TDM (HASHIMOTO *et al.*, 2004; DURIC

e DUMAN, 2013). Portanto, o fato de que o AU tenha a capacidade de modular estas vias de sinalização envolvidas na neuroplasticidade e sobrevivência celular, nos fez questionar o potencial neuroprotetor do AU frente a citotoxicidade da corticosterona. Uma evidência que reforça a nossa hipótese reside no fato de que o AU já tem apresentado um efeito tipo-antidepressivo e anti-estresse em modelos animais e *in vitro*, além de um potencial neuroprotetor frente a diversos insultos neurotóxicos (COLLA, 2015).

Para responder a esta pergunta, nós utilizamos um modelo *in vitro* que mimetiza o efeito citotóxico da corticosterona em células HT22. O emprego destas células é um dos pontos mais fortes do nosso modelo experimental, sendo que as células HT22 são derivadas de hipocampo de camundongos, expressam receptores específicos para glicocorticóides e são especialmente responsivas e sensíveis aos efeitos citotóxicos da corticosterona (BEHL, *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2015). Ainda, a inibição do efeito citotóxico da corticosterona exercido pelo RU486 (antagonista competitivo de GR) nos permitiu comprovar que a ativação de GR parece mediar, em parte, os efeitos da corticosterona nas células HT22 (BEHL *et al.*, 1997; FREITAS *et al.*, 2015)

Um dos resultados mais importantes do nosso trabalho foi observar que o AU exerce efeitos citoprotetores frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona em células da linhagem HT22. Em concordância com estudos da literatura, o AU exerceu efeitos citoprotetores frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona em uma faixa de concentração (5-15 μ M) (SHIH *et al.*, 2004) e com o mesmo tempo de incubação (48 h) observados em trabalhos prévios (HEO *et al.*, 2002; HONG *et al.*, 2012).

Um estudo prévio do nosso grupo tinha demonstrado que a administração crônica de AU em camundongos foi capaz de prevenir o aumento da expressão de *bax* e aumentou a razão da expressão de proteínas anti versus pró-apoptóticas (*bcl-2/bax*) no hipocampo de camundongos submetidos a um protocolo de ECI (COLLA, 2015). Os nossos resultados do modelo *in vitro* reforçam estes achados se consideramos que o AU foi capaz de prevenir a morte celular por apoptose induzida pela corticosterona. Ainda, o AU foi capaz de prevenir a formação de vesículas ácidas, o qual indica a inibição de mecanismos de autofagia aumentados nas células expostas à corticosterona. Contudo, não podemos afirmar no nosso trabalho se ocorreram mecanismos de autofagia devido à ausência de uma confirmação bioquímica das proteínas envolvidas neste processo.

Assim como observado no efeito tipo-antidepressivo, o efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22 parece depender, pelo menos em parte, da ativação de PKA, PKC, ERK1/2 e CaMKII. Todavia, no nosso estudo *in vitro* observamos que o imunoconteúdo de HO-1 foi similar em todos os tratamentos. Ainda, deve ser destacado que a ausência de um estudo que utilize moduladores específicos da atividade de HO-1 foi uma limitação importante para determinar a participação desta enzima no efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona.

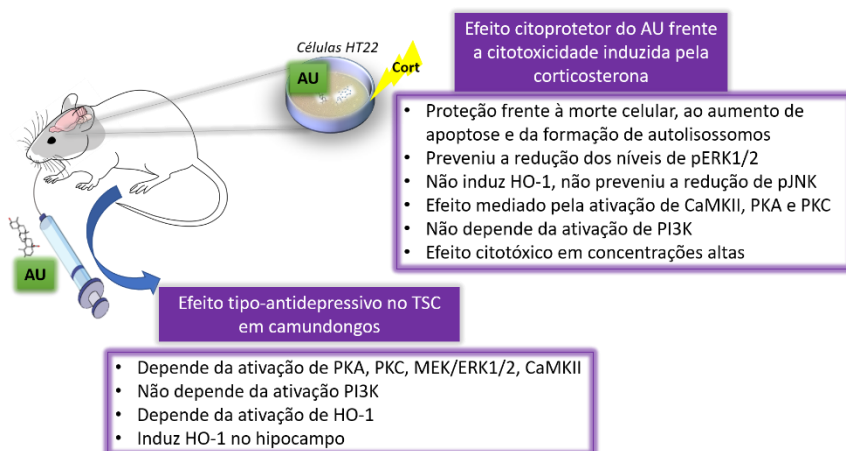
Um dado interessante foi a ausência da participação da PI3K tanto no efeito tipo-antidepressivo do AU nos camundongos submetidos ao TSC quanto no efeito citoprotetor do AU frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona. Estas evidências parecem indicar que o AU parece não modular a via de sinalização dependente de PI3K para exercer um efeito tipo-antidepressivo e citoprotetor.

Finalmente, deve ser destacado que os nossos resultados sugerem que o AU poderia estar ativando diversas vias de sinalização intracelular e que estas, por sua vez, poderiam estar sendo moduladas entre si. Entretanto, não devemos descartar também a possibilidade de que o AU possa atuar individualmente em cada uma destas proteínas cinase e assim, exercer efeitos pleiotrópicos sobre diversas vias de sinalização. Sendo assim, a capacidade do AU em atuar sobre diferentes vias de sinalização intracelulares resulta de interesse para o seu estudo no tratamento de doenças neurodegenerativas e em transtornos psiquiátricos como o TDM.

Considerando estas evidencias, a principal contribuição do nosso trabalho é que: o AU exerce um efeito tipo-antidepressivo no TSC em camundongos e um efeito citoprotetor frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22, os quais dependem, pelo menos em parte, da ativação de PKA, PKC, ERK1/2 e CaMKII mas não da ativação de PI3K. Ainda, o efeito tipo-antidepressivo do AU parece também depender da atividade de HO-1. Esta conclusão deriva das seguintes evidencias: a) os inibidores de PKA, PKC e CaMKII (H-89, queleritrina e KN-62) aboliram o efeito tipo antidepressivo do AU no TSC em camundongos e o efeito citoprotetor frente a citotoxicidade induzida pela corticosterona em células HT22, b) os inibidores de MEK/ERK1/2 (PD98059 e U0126) inibiram o efeito tipo antidepressivo do AU no TSC em camundongos, c) inibidores de PI3K (wortmanina e LY294002) não preveniram o efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao TSC e também o LY294002 o efeito citoprotetor do AU frente à citotoxicidade da corticosterona em células HT22, d) a incubação de células HT22 com AU reverteu os níveis de fosforilação de ERK1/2 reduzidos nas células HT22 incubadas com corticosterona, e) o efeito tipo antidepressivo do AU no

TSC em camundongos foi abolido por um inibidor de HO-1 (PPZn), f) a combinação de doses sub-efetivas de PPCo (indutor de HO-1) junto com doses sub-efetivas de AU exerceu um efeito tipo-antidepressivo no TSC em camundongos e, g) o AU (assim como a PPCo) induziu um incremento do imunconteúdo de HO-1 no hipocampo dos camundongos mas não alterou o nível de HO-1 nas células HT22 expostas à citotoxicidade induzida pela corticosterona.

Figura 8.1: Resumo esquematizado dos principais achados do presente trabalho



AU exerce efeitos tipo-antidepressivos em testes preditivos de atividade antidepressiva que dependem da ativação de proteínas cinase envolvidas na proliferação e sobrevivência celular assim como da ativação de HO-1, uma enzima envolvida em mecanismos antioxidantes. Estas mesmas proteínas cinase estão envolvidas no efeito citoprotetor do AU testado em células HT22 derivadas de hipocampo de camundongos expostas à corticosterona. *Abreviaturas: ácido ursólico, AU; corticosterona, Cort; proteína cinase regulada por sinal extracelular, ERK; proteína cinase A, PKA; proteína cinase C, PKC; proteína cinase ativada por mitógeno, MEK; proteína cinase II dependente de Ca²⁺/calmodulina II, CaMKII; heme oxigenase I; HO-1.* A figura foi produzida pelo autor com permissão usando “Mind the Graph” (www.mindthegraph.com)

9. CONCLUSÃO

- O efeito tipo-antidepressivo do AU em camundongos no TSC depende em parte da ativação de proteínas cinases PKA, PKC, MEK 1/2 e CaMKII assim como da enzima HO-1, mas não da atividade de PI3K.
- O AU exerce um efeito citoprotetor frente à citotoxicidade e à apoptose induzido pela corticosterona em células HT22 que depende, pelo menos em parte, da ativação de PKA, PKC, ERK1/2 e CaMKII, mas não de PI3K ou HO-1.
- Em concentrações altas, o AU induz efeitos citotóxicos e reduz da viabilidade de células HT22.

10. PERSPECTIVAS

- Investigar o papel de proteínas neurotróficas e envolvidas na plasticidade sináptica sobre o efeito citoprotetor do AU frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona *in vitro*.
- Investigar o efeito neuroprotetor do AU em um modelo *ex vivo* frente à citotoxicidade induzida pela corticosterona.
- Avaliar o efeito do AU sobre mecanismos de autofagia relacionados com a citotoxicidade da corticosterona em células HT22.
- Avaliar a interação entre o AU e o GR em um modelo *in silico* e *in vitro*.
- Analisar o efeito antioxidante do AU sobre o fenótipo tipo-depressivo em camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico.

11. REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, B. A.; SALAMA, R. H. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 1, p. 59-65, 2011.
- ABRAHAM, I. M. *et al.* Action of glucocorticoids on survival of nerve cells: promoting neurodegeneration or neuroprotection? **J Neuroendocrinol**, v. 13, n. 9, p. 749-760, 2001.
- ABRAHÁM, I. M.; MEERLO, P.; LUITEN, P. G. Concentration dependent actions of glucocorticoids on neuronal viability and survival. **Dose Response**, v. 4, n. 1, p. 38-54, 2006.
- ABRIAL, E. *et al.* Protein kinase C regulates mood-related behaviors and adult hippocampal cell proliferation in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 43, p. 40-48, 2013.
- ABRIAL, E. *et al.* A role for the PKC signaling system in the pathophysiology and treatment of mood disorders: involvement of a functional imbalance? **Mol Neurobiol**, v. 44, n. 3, p. 407-419, 2011.
- ALAM, J. *et al.* Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. **J Biol Chem**, v. 274, n. 37, p. 26071-26078, 1999.
- ALMEIDA, O. F. *et al.* Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. **FASEB J**, v. 14, n. 5, p. 779-790, 2000.
- ALMEIDA, R. C. *et al.* Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. **Neurosci Lett**, v. 395, n. 2, p. 93-97, 2006.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5**. 5th. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 2013. xlv, 947 p.
- ANACKER, C. *et al.* The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 4154-25, 2011.
- ANDERSON, K. N.; BRADLEY, A. J. Sleep disturbance in mental health problems and neurodegenerative disease. **Nat Sci Sleep**, v. 5, p. 61-75, 2013.
- APPLEGATE, L. A.; LUSCHER, P.; TYRRELL, R. M. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. **Cancer Res**, v. 51, n. 3, p. 974-978, 1991.
- ARNONE, D. *et al.* State-dependent changes in hippocampal grey matter in depression. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 12, p. 1265-1272, 2013.

- BANASR, M.; DWYER, J. M.; DUMAN, R. S. Cell atrophy and loss in depression: reversal by antidepressant treatment. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 6, p. 730-737, 2011.
- BANG, H. S. *et al.* Ursolic Acid-induced elevation of serum irisin augments muscle strength during resistance training in men. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 5, p. 441-446, 2014.
- BARAÑANO, D. E.; SNYDER, S. H. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 10996-1002, 2001.
- BARAUNA, S. C. *et al.* Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (*ConBr*) administered centrally in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, n. 1, p. 160-169, 2006.
- BAYER, T. A. *et al.* Antidepressant drug exposure is associated with mRNA levels of tyrosine receptor kinase B in major depressive disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 24, n. 6, p. 881-888, 2000.
- BEAULIEU, J. M. A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. **J Psychiatry Neurosci**, v. 37, n. 1, p. 7-16, 2012.
- BEAULIEU, J. M. *et al.* Regulation of Akt signaling by D2 and D3 dopamine receptors in vivo. **J Neurosci**, v. 27, n. 4, p. 881-885, 2007.
- BEHL, C. *et al.* Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 101-106, 1997.
- BEHL, C. *et al.* Protection against oxidative stress-induced neuronal cell death--a novel role for RU486. **Eur J Neurosci**, v. 9, n. 5, p. 912-920, 1997.
- BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C.; FREY, B. N. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 609421, 2012.
- BETTIO, L. E. *et al.* Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 127, p. 7-14, 2014.
- BHAT, R. A. *et al.* Effect of ursolic acid in attenuating chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 30, n. 6, p. 517-528, 2016.
- BIRKS, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD005593, 2006.

- BOHN, T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. **Nutr Rev**, v. 72, n. 7, p. 429-452, 2014.
- BRAŃSKI, P. *et al.* Antidepressant-like activity of 8-Br-cAMP, a PKA activator, in the forced swim test. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 115, n. 6, p. 829-830, 2008.
- BRAVO, J. A. *et al.* Desipramine prevents stress-induced changes in depressive-like behavior and hippocampal markers of neuroprotection. **Behav Pharmacol**, v. 20, n. 3, p. 273-285, 2009.
- BRAZIL, D. P.; YANG, Z. Z.; HEMMINGS, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 5, p. 233-242, 2004.
- BREMNER, J. D. *et al.* Hippocampal volume reduction in major depression. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 1, p. 115-118, 2000.
- BREMNER, J. D. *et al.* MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **Am J Psychiatry**, v. 152, n. 7, p. 973-981, 1995.
- BROMET, E. *et al.* Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Med**, v. 9, p. 90, 2011.
- BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 7, p. 519-529, 2009.
- BUDNI, J. *et al.* Involvement of PI3K, GSK-3 β and PPAR γ in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 5, p. 714-723, 2012.
- BUDZISZEWSKA, B. *et al.* The decrease in JNK- and p38-MAP kinase activity is accompanied by the enhancement of PP2A phosphate level in the brain of prenatally stressed rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 61, n. 2, p. 207-215, 2010.
- CALIGIANI, A. *et al.* A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. **Food Chem**, v. 136, n. 2, p. 735-741, 2013.
- CAMERON, H. A.; MCKAY, R. D. Restoring production of hippocampal neurons in old age. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 10, p. 894-7, 1999.
- CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 6, p. 417-26, 2004.
- CAMPBELL, S. *et al.* Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 4, p. 598-607, 2004.

CASTRO, A. J. *et al.* The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulinomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1850, n. 1, p. 51-61, 2015.

CHA, H. J. *et al.* Ursolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells. **Oncogene**, v. 16, n. 6, p. 771-778, 1998.

CHANDRAMU, C. *et al.* Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo L.* **Phytother Res**, v. 17, n. 2, p. 129-34, 2003.

CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. **Physiol Rev**, v. 93, n. 3, p. 1139-206, 2013.

CHATTOPADHYAY, D. *et al.* CNS activity of the methanol extract of *Mallotus peltatus (Geist)* Muell Arg. leaf: an ethnomedicine of Onge. **J Ethnopharmacol**, v. 85, n. 1, p. 99-105, 2003.

CHEN, B. *et al.* Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260-5, 2001.

CHEN, J. Heme oxygenase in neuroprotection: from mechanisms to therapeutic implications. **Rev Neurosci**, v. 25, n. 2, p. 269-80, 2014.

CHEN, J.; ZHANG, Z.; CAI, L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. **Diabetes Metab J**, v. 38, n. 5, p. 337-45, 2014.

CHEN, Q. *et al.* Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. **Anal Bioanal Chem**, v. 399, n. 8, p. 2877-84, 2011.

CHEN, S. J. *et al.* Antidepressant administration modulates neural stem cell survival and serotonergic differentiation through bcl-2. **Curr Neurovasc Res**, v. 4, n. 1, p. 19-29, 2007.

CHEN, Y. *et al.* Upregulation of heme oxygenase-1 expression may facilitate memory and learning in mice. **Exp Ther Med**, v. 5, n. 5, p. 1491-1495, 2013.

CHERRA, S. J.; CHU, C. T. Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. **Future Neurol**, v. 3, n. 3, p. 309-323, 2008.

CHOW, V. W. *et al.* An overview of APP processing enzymes and products. **Neuromolecular Med**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2010.

- CHUNG, Y. K. *et al.* Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana L* on the acetylcholinesterase. **Mol Cells**, v. 11, n. 2, p. 137-43, 2001.
- COLE, J. *et al.* Hippocampal atrophy in first episode depression: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. **J Affect Disord**, v. 134, n. 1-3, p. 483-7, 2011.
- COLLA, A. R. **Efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do ácido ursólico em camundongos em diferentes modelos animais.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, 2015. p. 168
- COLLA, A. R. *et al.* Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 124, p. 108-16, 2014.
- COLLA, A. R. *et al.* Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 758, p. 171-6, 2015.
- COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **Br J Psychiatry**, v. 113, n. 504, p. 1237-64, 1967.
- CORACI, I. S. *et al.* CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. **Am J Pathol**, v. 160, n. 1, p. 101-12, 2002.
- COSI, C. *et al.* Glucocorticoids depress activity-dependent expression of BDNF mRNA in hippocampal neurones. **Neuroreport**, v. 4, n. 5, p. 527-30, 1993.
- CUNHA, M. P. *et al.* Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 5, p. 2954-68, 2016.
- CUNHA, M. P. *et al.* Involvement of PKA, PKC, CAMKII and MEK1/2 in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 4, p. 653-9, 2014.
- CUNHA, M. P. *et al.* Protective effect of creatine against 6-hydroxydopamine-induced cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Involvement of intracellular signaling pathways. **Neuroscience**, v. 238, p. 185-94, 2013.
- CZÉH, B. *et al.* Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 22, p. 12796-801, 2001.
- D'SA, C.; DUMAN, R. S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord**, v. 4, n. 3, p. 183-94, 2002.

- DAR, B. A. *et al.* Synthesis and screening of ursolic acid-benzylidene derivatives as potential anti-cancer agents. **Eur J Med Chem**, v. 111, p. 26-32, 2016.
- DAVID, S.; KALB, R. G. Serum/glucocorticoid-inducible kinase can phosphorylate the cyclic AMP response element binding protein, CREB. **FEBS Lett**, v. 579, n. 6, p. 1534-8, 2005.
- DAVIES, S. P. *et al.* Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochem J**, v. 351, n. Pt 1, p. 95-105, 2000.
- DE LAS HERAS, B. *et al.* Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. **Curr Top Med Chem**, v. 3, n. 2, p. 171-85, 2003.
- DÉCIGA-CAMPOS, M. *et al.* Isobolographic analysis of the antinociceptive interaction between ursolic acid and diclofenac or tramadol in mice. **Planta Med**, v. 80, n. 2-3, p. 139-45, 2014.
- DELGADO, P. L. Depression: the case for a monoamine deficiency. **J Clin Psychiatry**, v. 61 Suppl 6, p. 7-11, 2000.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-7, 1986.
- DI BENEDETTO, M. *et al.* Alterations of CREB and DARPP-32 phosphorylation following cocaine and monoaminergic uptake inhibitors. **Brain Res**, v. 1128, n. 1, p. 33-9, 2007.
- DING, H. *et al.* Ursolic Acid Ameliorates Early Brain Injury After Experimental Traumatic Brain Injury in Mice by Activating the Nrf2 Pathway. **Neurochem Res**, v. 42, n. 2, p. 337-346, 2017.
- DREVETS, W. C. *et al.* Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 824-7, 1997.
- DU, J. *et al.* Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 3, p. 243-8, 2004.
- DUDLEY, D. T. *et al.* A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 7686-9, 1995.
- DUMAN, C. H. *et al.* A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 661-70, 2007.
- DUMAN, R. S. Depression: a case of neuronal life and death? **Biol Psychiatry**, v. 56, n. 3, p. 140-5, 2004.

DUMAN, R. S.; LI, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1601, p. 2475-84, 2012.

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

DURIC, V.; DUMAN, R. S. Depression and treatment response: dynamic interplay of signaling pathways and altered neural processes. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 1, p. 39-53, 2013.

DWIVEDI, Y.; PANDEY, G. N. Adenylyl cyclase-cyclicAMP signaling in mood disorders: role of the crucial phosphorylating enzyme protein kinase A. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 4, n. 1, p. 161-76, 2008.

DWIVEDI, Y. *et al.* ERK MAP kinase signaling in post-mortem brain of suicide subjects: differential regulation of upstream Raf kinases Raf-1 and B-Raf. **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 86-98, 2006.

DWIVEDI, Y. *et al.* Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 916-28, 2001.

DZUBAK, P. *et al.* Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat Prod Rep**, v. 23, n. 3, p. 394-411, 2006.

EGELAND, M.; ZUNSZAIN, P. A.; PARIANTE, C. M. Molecular mechanisms in the regulation of adult neurogenesis during stress. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 4, p. 189-200, 2015.

ESCH, T. *et al.* The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 23, n. 3, p. 199-208, 2002.

EWING, J. F.; MAINES, M. D. Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 12, p. 5364-8, 1991.

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

FARIA, C. D. C.; LONGUI, C. A. Aspectos moleculares da sensibilidade aos glicocorticóides. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 983-995, 2006.

FAVATA, M. F. *et al.* Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 29, p. 18623-32, 1998.

FIENBERG, A. A.; GREENGARD, P. The DARPP-32 knockout mouse. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 31, n. 2-3, p. 313-9, 2000.

- FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 1907-16, 2005.
- FREITAS, A. E. *et al.* Agmatine, by Improving Neuroplasticity Markers and Inducing Nrf2, Prevents Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 5, p. 3030-45, Jul 2016.
- FREITAS, A. E. *et al.* Agmatine induces Nrf2 and protects against corticosterone effects in hippocampal neuronal cell line. **Mol Neurobiol**, v. 51, n. 3, p. 1504-19, 2015.
- FUMAGALLI, F. *et al.* Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. **J Neurochem**, v. 93, n. 6, p. 1551-60, 2005.
- GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C. Regionally selective activation and differential regulation of ERK, JNK and p38 MAP kinase signalling pathway by protein kinase C in mood modulation. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 15, n. 6, p. 781-93, 2012.
- GALLAGHER, P.; YOUNG, A. H. Mifepristone (RU-486) treatment for depression and psychosis: a review of the therapeutic implications. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 2, n. 1, p. 33-42, 2006.
- GAO, D.; LI, N.; LI, Q.; LI, J.; HAN, Z.; FAN, Y. *et al.* Study of the extraction, purification and antidiabetic potential of ursolic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. **Therapy**, v. 5, n. 5, p. 697-705, 2008.
- GASSEN, N. C. *et al.* Association of FKBP51 with priming of autophagy pathways and mediation of antidepressant treatment response: evidence in cells, mice, and humans. **PLoS Med**, v. 11, n. 11, p. e1001755, 2014.
- GEERLINGS, M. I.; GERRITSEN, L. Late-life Depression, Hippocampal Volumes, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation: A Systematic Review and Meta-analysis. **Biol Psychiatry**, 2017.
- GILBERTSON, M. W. *et al.* Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 11, p. 1242-7, 2002.
- GOLD, P. W.; GOODWIN, F. K.; CHROUSOS, G. P. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress (1). **N Engl J Med**, v. 319, n. 6, p. 348-53, 1988.
- GONCALVES, F. M. *et al.* Signaling pathways underlying the antidepressant-like effect of inosine in mice. **Purinergic Signal**, 2016.
- GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 31, p. 5319-41, 2012.

GONZÁLEZ-CORTAZAR, M. *et al.* Isosakuranetin-5-O-rutinoside: a new flavanone with antidepressant activity isolated from *Salvia elegans* Vahl. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13260-70, 2013.

GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. *et al.* Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. **Planta Med**, v. 78, n. 8, p. 793-6, 2012.

GOOSENS, K.; SAPOLSKY, R. Stress and Glucocorticoid Contributions to Normal and Pathological Aging. In: RIDDLE, D. (Ed.). **Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms**: CRC Press/Taylor & Francis, 2007. cap. 13,

GOULD, E.; CAMERON, H. A. Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. **Dev Neurosci**, v. 18, n. 1-2, p. 22-35, 1996.

GOULD, T. D.; MANJI, H. K. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. **J Psychosom Res**, v. 53, n. 2, p. 687-97, 2002.

GRANDÉR, D. *et al.* Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. **Autophagy**, v. 5, n. 8, p. 1198-200, 2009.

GRASSMANN, J. Terpenoids as plant antioxidants. **Vitam Horm**, v. 72, p. 505-35, 2005.

GREISEN, M. H. *et al.* Increased adult hippocampal brain-derived neurotrophic factor and normal levels of neurogenesis in maternal separation rats. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 6, p. 772-8, 2005.

GRUVER-YATES, A. L.; CIDLOWSKI, J. A. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. **Cells**, v. 2, n. 2, p. 202-23, 2013.

GUILLET, B. A. *et al.* Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. **Neurochem Int**, v. 46, n. 4, p. 337-46, 2005.

GUITART, X.; NESTLER, E. J. Chronic administration of lithium or other antidepressants increases levels of DARPP-32 in rat frontal cortex. **J Neurochem**, v. 59, n. 3, p. 1164-7, 1992.

GUPTA, P.; LAHIRI, D. Aligned carbon nanotube containing scaffolds for neural tissue regeneration. **Neural Regen Res**, v. 11, n. 7, p. 1062-3, 2016.

GUTIÉRREZ-UZQUIZA, Á. *et al.* p38 α mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: effect on the p70S6K pathway. **J Biol Chem**, v. 287, n. 4, p. 2632-42, 2012.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annu Rev Clin Psychol**, v. 1, p. 293-319, 2005.

- HARLAN, J. *et al.* Variants in Apaf-1 segregating with major depression promote apoptosome function. **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 76-85, 2006.
- HASHIMOTO, K.; SHIMIZU, E.; IYO, M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 45, n. 2, p. 104-14, 2004.
- HASSAN, A. H. *et al.* Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. **Exp Neurol**, v. 140, n. 1, p. 43-52, 1996.
- HE, M. *et al.* Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. **Neural Regen Res**, v. 8, n. 14, p. 1297-306, 2013.
- HE, Y. *et al.* Ursolic acid increases glucose uptake through the PI3K signaling pathway in adipocytes. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110711, 2014.
- HÉLÈNE, R. *et al.* Retinoids and glucocorticoids have opposite effects on actin cytoskeleton rearrangement in hippocampal HT22 cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 71, p. 102-10, 2016.
- HENKE, P. G. Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. **Brain Res Bull**, v. 25, n. 5, p. 691-5, 1990.
- HENRY, M. E. *et al.* A comparison of brain and serum pharmacokinetics of R-fluoxetine and racemic fluoxetine: A 19-F MRS study. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 8, p. 1576-83, 2005.
- HEO, H. J. *et al.* Ursolic acid of *Origanum majorana L.* reduces Abeta-induced oxidative injury. **Mol Cells**, v. 13, n. 1, p. 5-11, 2002.
- HERBERT, J. M. *et al.* Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 172, n. 3, p. 993-9, 1990.
- HIRSCHFELD, R. M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J Clin Psychiatry**, v. 61 Suppl 6, p. 4-6, 2000.
- HONG, S. Y.; JEONG, W. S.; JUN, M. Protective effects of the key compounds isolated from *Corni fructus* against β -amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10831-45, 2012.
- HOROWITZ, M. A. **Molecular and cellular effects of glucocorticoids, inflammation and antidepressant compounds in a cellular model of depression.** London, UK: King's College London, 2016. 336p
- HOU, G. *et al.* Autophagy does not lead to the asymmetrical hippocampal injury in chronic stress. **Physiol Behav**, v. 144, p. 1-6, 2015.

- HOWLAND, R. H. Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression (STAR*D). Part 2: Study outcomes. **J Psychosoc Nurs Ment Health Serv**, v. 46, n. 10, p. 21-4, 2008.
- HUA, W. J. *et al.* The influence of herbal medicine ursolic acid on the uptake of rosuvastatin mediated by OATP1B1*1a and *5. **Eur J Drug Metab Pharmacokin**, v. 39, n. 3, p. 221-30, 2014.
- IBARRA, A. *et al.* Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. **Phytomedicine**, v. 17, n. 6, p. 397-403, My 2010.
- IKEDA, Y. *et al.* Aggregated ursolic acid, a natural triterpenoid, induces IL-1beta release from murine peritoneal macrophages: role of CD36. **J Immunol**, v. 178, n. 8, p. 4854-64, 2007.
- IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Mol Nutr Food Res**, v. 52, n. 1, p. 26-42, 2008.
- ISHIGE, K. *et al.* The activation of dopamine D4 receptors inhibits oxidative stress-induced nerve cell death. **J Neurosci**, v. 21, n. 16, p. 6069-76, 2001.
- JAGER, S. *et al.* Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016-31, 2009.
- JANTAS, D. Cell-Based Systems of Depression: An Overview. In: GROSSO, C. (Ed.). **Herbal Medicine in Depression**. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. cap. 3, p.75-117p.
- JEON, S. J. *et al.* Ursolic acid enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic neurotransmission in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 762, p. 443-8, 2015.
- JETTER, R.; SCHÄFFER, S. Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface. Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. **Plant Physiol**, v. 126, n. 4, p. 1725-37, 2001.
- JIA, J.; LE, W. Molecular network of neuronal autophagy in the pathophysiology and treatment of depression. **Neurosci Bull**, v. 31, n. 4, p. 427-34, 2015.
- JODEIRI FARSHBAF, M. *et al.* Does PGC1 α /FNDC5/BDNF Elicit the Beneficial Effects of Exercise on Neurodegenerative Disorders? **Neuromolecular Med**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2016.
- JOTHIE RICHARD, E. *et al.* Anti-stress Activity of *Ocimum sanctum*: Possible Effects on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **Phytother Res**, v. 30, n. 5, p. 805-14, 2016.

- KANASHIRO, C. A.; KHALIL, R. A. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 25, n. 12, p. 974-85, 1998.
- KAREGE, F. *et al.* Alterations in phosphatidylinositol 3-kinase activity and PTEN phosphatase in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. **Neuropsychobiology**, v. 63, n. 4, p. 224-31, 2011.
- KARSON, C. N. *et al.* Human brain fluoxetine concentrations. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 322-9, 1993.
- KASHYAP, D.; TULI, H. S.; SHARMA, A. K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. **Life Sci**, v. 146, p. 201-13, 2016.
- KESERVANI, R. K.; SHARMA, A. K.; KESHARWANI, R. K. Medicinal Effect of Nutraceutical Fruits for the Cognition and Brain Health. **Scientifica (Cairo)**, v. 2016, p. 3109254, 2016.
- KIM, J. H.; KIM, G. H.; HWANG, K. H. Monoamine Oxidase and Dopamine β -Hydroxylase Inhibitors from the Fruits of *Gardenia jasminoides*. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 20, n. 2, p. 214-9, 2012.
- KIM, K. A. *et al.* Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. **Life Sci**, v. 74, n. 22, p. 2769-79, 2004.
- KIM, S. H. *et al.* Electroconvulsive seizure increases phosphorylation of PKC substrates, including GAP-43, MARCKS, and neurogranin, in rat brain. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 1, p. 115-21, 2010.
- KITAGISHI, Y. *et al.* Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. **Depress Res Treat**, v. 2012, p. 752563, 2012.
- KLEIN, P. J. *et al.* The effects of a novel MEK inhibitor PD184161 on MEK-ERK signaling and growth in human liver cancer. **Neoplasia**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2006.
- KLIONSKY, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1-222, 2016.
- KOSTEN, T. A. *et al.* Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 7, p. 1545-58, 2008.
- KOWALSKI, R. Studies of selected plant raw materials as alternative sources of triterpenes of oleanolic and ursolic acid types. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 3, p. 656-62, 2007.

- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal models of depression: molecular perspectives. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 7, p. 121-47, 2011.
- KRÖNKE, G. *et al.* Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. **J Biol Chem**, v. 278, n. 51, p. 51006-14, 2003.
- KUMAR, H., KIM, I. S., MORE, S. V., KIM, B. W., CHOI, D. K. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. **Nat Prod Rep**, v. 31, n. 1, p. 109-139, 2014.
- KUMAR, V.; BHAT, Z. A.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: a comprehensive review. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 68, n. 2, p. 175-83, 2013.
- KUNII, Y. *et al.* Revisiting DARPP-32 in postmortem human brain: changes in schizophrenia and bipolar disorder and genetic associations with t-DARPP-32 expression. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 192-9, 2014.
- KUREK, A. *et al.* Pro-apoptotic Action of Corticosterone in Hippocampal Organotypic Cultures. **Neurotox Res**, v. 30, n. 2, p. 225-38, 2016.
- LANG, F.; STOURNARAS, C. Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. **Hormones (Athens)**, v. 12, n. 2, p. 160-71, 2013.
- LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J Pharmacol Methods**, v. 16, n. 4, p. 355-7, 1986.
- LEAL, A. S. *et al.* Synthesis of novel ursolic acid heterocyclic derivatives with improved abilities of antiproliferation and induction of p53, p21waf1 and NOXA in pancreatic cancer cells. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 19, p. 5774-86, 2012.
- LEE, H. J. *et al.* Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. **Mol Psychiatry**, v. 6, n. 6, p. 610, 725-8, 2001.
- LEE, S. *et al.* Phytochemical constituents from the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. **Arch Pharm Res**, v. 25, n. 3, p. 280-4, 2002.
- LEE, S. Y. *et al.* Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 224-35, 2013.
- LEEM, Y. H. *et al.* Disrupted MEK/ERK signaling in the medial orbital cortex and dorsal endopiriform nuclei of the prefrontal cortex in a

- chronic restraint stress mouse model of depression. **Neurosci Lett**, v. 580, p. 163-8, 2014.
- LEENDERS, A. G.; SHENG, Z. H. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: implications for presynaptic plasticity. **Pharmacol Ther**, v. 105, n. 1, p. 69-84, 2005.
- LENG, S. *et al.* Ursolic acid promotes cancer cell death by inducing Atg5-dependent autophagy. **Int J Cancer**, v. 133, n. 12, p. 2781-90, 2013.
- LEUNG, A. Y.; FOSTER, S. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics**
Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics. 2nd. New York: John Wiley e Sons Inc, 1996.
- LEVIN, E. Y.; LEVENBERG, B.; KAUFMAN, S. The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. **J Biol Chem**, v. 235, p. 2080-6, 1960.
- LI, L. *et al.* Changes of Bax, Bcl-2 and apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. **Neurol Res**, v. 32, n. 6, p. 579-86, 2010.
- LI, L. *et al.* Autophagy and hippocampal neuronal injury. **Sleep Breath**, v. 18, n. 2, p. 243-9, 2014.
- LI, L. *et al.* Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. **Brain Res**, v. 1497, p. 32-9, 2013.
- LI, X. *et al.* Corticosterone-induced rapid phosphorylation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in PC12 cells. **FEBS Lett**, v. 492, n. 3, p. 210-4, 2001.
- LI, Y. *et al.* Ursolic acid stimulates lipolysis in primary-cultured rat adipocytes. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, n. 11, p. 1609-17, 2010.
- LI, Y. *et al.* Enhancement of chemotherapeutic agent-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB using ursolic acid. **Int J Cancer**, v. 127, n. 2, p. 462-73, 2010.
- LIANG, W. *et al.* Ursolic acid attenuates beta-amyloid-induced memory impairment in mice. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 74, n. 6, p. 482-8, 2016.
- LIANG, Y. *et al.* Antidepressant-like pharmacological profile of a novel triple reuptake inhibitor, (1S,2S)-3-(methylamino)-2-(naphthalen-2-yl)-1-phenylpropan-1-ol (PRC200-SS). **J Pharmacol Exp Ther**, v. 327, n. 2, p. 573-83, 2008.
- LIAO, Q. *et al.* LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation Lu-Ying extract. **Yakugaku Zasshi**, v. 125, n. 6, p. 509-15, 2005.

- LIBY, K. T.; YORE, M. M.; SPORN, M. B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 5, p. 357-69, 2007.
- LIEBLICH, S. M. *et al.* High heterogeneity and low reliability in the diagnosis of major depression will impair the development of new drugs. **BJPsych Open**, v. 1, n. 2, p. e5-e7, 2015.
- LIN, H. Y. *et al.* Desipramine protects neuronal cell death and induces heme oxygenase-1 expression in Mes23.5 dopaminergic neurons. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50138, 2012.
- LINKER, R. A. *et al.* Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Brain**, v. 134, n. Pt 3, p. 678-92, 2011.
- LIOTTI, M.; MAYBERG, H. S. The role of functional neuroimaging in the neuropsychology of depression. **J Clin Exp Neuropsychol**, v. 23, n. 1, p. 121-36, 2001.
- LISMAN, J.; SCHULMAN, H.; CLINE, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 3, p. 175-90, 2002.
- LIU, B. *et al.* Ursolic acid induces neural regeneration after sciatic nerve injury. **Neural Regen Res**, v. 8, n. 27, p. 2510-9, 2013.
- LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 92-4, 22 2005.
- LIU, J.; LI, L.; SUO, W. Z. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. **Life Sci**, v. 84, n. 9-10, p. 267-71, 2009.
- LIU, J.; LIN, A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. **Cell Res**, v. 15, n. 1, p. 36-42, 2005.
- LIU, J. H. *et al.* Role of AC-cAMP-PKA Cascade in Antidepressant Action of Electroacupuncture Treatment in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 932414, 2012.
- LIU, Q. *et al.* Akt and mTOR mediate programmed necrosis in neurons. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1084, 2014.
- LOCHNER, A.; MOOLMAN, J. A. The many faces of H89: a review. **Cardiovasc Drug Rev**, v. 24, n. 3-4, p. 261-74, 2006.
- LU, C. C. *et al.* Ursolic acid triggers nonprogrammed death (necrosis) in human glioblastoma multiforme DBTRG-05MG cells through MPT pore opening and ATP decline. **Mol Nutr Food Res**, v. 58, n. 11, p. 2146-56, 2014.
- LU, J. *et al.* Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase

- β /nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 8, p. 1658-67, 2011.
- LU, J. *et al.* Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF- κ B pathway activation. **Cereb Cortex**, v. 20, n. 11, p. 2540-8, 2010.
- LU, J. *et al.* Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 7, p. 1078-90, 2007.
- LU, X. R.; ONG, W. Y. Heme oxygenase-1 is expressed in viable astrocytes and microglia but in degenerating pyramidal neurons in the kainate-lesioned rat hippocampus. **Exp Brain Res**, v. 137, n. 3-4, p. 424-31, 2001.
- LUCASSEN, P. J. *et al.* Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. **Eur J Neurosci**, v. 14, n. 1, p. 161-6, 2001.
- LUEDTKE, R. R. *et al.* Neuroprotective effects of high affinity Σ 1 receptor selective compounds. **Brain Res**, v. 1441, p. 17-26, 2012.
- MA, D. *et al.* Crucial role of heme oxygenase-1 in the sensitivity of acute myeloid leukemia cell line Kasumi-1 to ursolic acid. **Anticancer Drugs**, v. 25, n. 4, p. 406-14, 2014.
- MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chem**, v. 136, n. 2, p. 999-1005, 2013.
- MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: evidence for the involvement of the dopaminergic system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 204-11, 2012.
- MACQUEEN, G. M. *et al.* Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 3, p. 1387-92, 2003.
- MAGARIÑOS, A. M.; DESLANDES, A.; MCEWEN, B. S. Effects of antidepressants and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress. **Eur J Pharmacol**, v. 371, n. 2-3, p. 113-22, 1999.
- MAGESH, S., CHEN, Y., HU, L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. **Med Res Rev**, v. 32, n. 4, p. 687-726, 2012.
- MAHER, P.; DAVIS, J. B. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. **J Neurosci**, v. 16, n. 20, p. 6394-401, 1996.

- MAINES, M. D. Zinc protoporphyrin is a selective inhibitor of heme oxygenase activity in the neonatal rat. **Biochim Biophys Acta**, v. 673, n. 3, p. 339-50, 1981.
- MAINES, M. D.; KAPPAS, A. Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 71, n. 11, p. 4293-7, 1974.
- MAINES, M. D.; SINCLAIR, P. Cobalt regulation of heme synthesis and degradation in avian embryo liver cell culture. **J Biol Chem**, v. 252, n. 1, p. 219-23, 1977.
- MAINES, M. D.; TRAKSHEL, G. M.; KUTTY, R. K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. **J Biol Chem**, v. 261, n. 1, p. 411-9, 1986.
- MAIYAR, A. C. *et al.* Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response element within the serum/glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) gene promoter by the p53 tumor suppressor protein. **Mol Endocrinol**, v. 11, n. 3, p. 312-29, 1997.
- MALBERG, J. E.; BLENDY, J. A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 12, p. 631-8, 2005.
- MALBERG, J. E. *et al.* Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci**, v. 20, n. 24, p. 9104-10, 2000.
- MANJI, H. *et al.* Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 5, p. 293-307, 2012.
- MANOSSO, L. M. *et al.* Antidepressant-like effect of zinc is dependent on signaling pathways implicated in BDNF modulation. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 59, p. 59-67, 2015.
- MANOSSO, L. M. *et al.* **Evidence for the involvement of heme oxygenase 1 in the antidepressant-like effect of zinc**: Pharmacological Reports: *in press*, 2017.
- MAO, Q. Q. *et al.* Protective effects of piperine against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Cell Mol Neurobiol**, v. 32, n. 4, p. 531-7, 2012.
- MARKS, D. M.; PAE, C. U.; PATKAR, A. A. Triple reuptake inhibitors: the next generation of antidepressants. **Curr Neuropharmacol**, v. 6, n. 4, p. 338-43, 2008.
- MARTÍN-DE-SAAVEDRA, M. D. *et al.* Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 2010-22, 2013.

- MAURICE, T.; LOCKHART, B. P.; PRIVAT, A. Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. **Brain Res**, v. 706, n. 2, p. 181-93, 1996.
- MCEWEN, B. S. *et al.* Mechanisms of stress in the brain. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 1353-63, 2015.
- MCKINNON, M. C. *et al.* A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. **J Psychiatry Neurosci**, v. 34, n. 1, p. 41-54, 2009.
- MENDEZ-DAVID, I. *et al.* Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression. **Neurosci Lett**, v. 597, p. 121-6, 2015.
- MERCIER, G. *et al.* MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes. **J Mol Neurosci**, v. 24, n. 2, p. 207-16, 2004.
- MIGUEL-HIDALGO, J. J.; RAJKOWSKA, G. Comparison of prefrontal cell pathology between depression and alcohol dependence. **J Psychiatr Res**, v. 37, n. 5, p. 411-20, 2003.
- MOBERG, G. P. Problems in defining stress and distress in animals. **J Am Vet Med Assoc**, v. 191, n. 10, p. 1207-11, 1987.
- MOLZ, S. *et al.* Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. **Neurochem Res**, v. 33, n. 1, p. 27-36, 2008.
- MONTEIRO, M. C. *et al.* Neuroprotection in Neurodegenerative Disease: From Basic Science to Clinical Applications. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 2949102, 2017.
- MOON, H. S.; DINCER, F.; MANTZOROS, C. S. Pharmacological concentrations of irisin increase cell proliferation without influencing markers of neurite outgrowth and synaptogenesis in mouse H19-7 hippocampal cell lines. **Metabolism**, v. 62, n. 8, p. 1131-6, 2013.
- MORETTI, M. *et al.* Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res**, v. 48, n. 1, p. 16-24, 2014.
- MORETTI, M. *et al.* Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 3, p. 331-40, 2012.
- MORGAN, S. A. *et al.* 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2506-15, 2009.

- MORIMOTO, B. H.; KOSHLAND, D. E. Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line. **Neuron**, v. 5, n. 6, p. 875-80, 1990.
- MORIMOTO, M. *et al.* Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. **Neurosci Res**, v. 26, n. 3, p. 235-69, 1996.
- MORTIBOYS, H.; AASLY, J.; BANDMANN, O. Ursocholic acid rescues mitochondrial function in common forms of familial Parkinson's disease. **Brain**, v. 136, n. Pt 10, p. 3038-50, 2013.
- MORTIBOYS, H. *et al.* Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. **Ann Neurol**, v. 64, n. 5, p. 555-65, 2008.
- MUÑOZ, A. M. *et al.* Glial overexpression of heme oxygenase-1: a histochemical marker for early stages of striatal damage. **J Chem Neuroanat**, v. 29, n. 2, p. 113-26, 2005.
- MURRAY, A. J. Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. **Sci Signal**, v. 1, n. 22, p. re4, 2008.
- MURRAY, F.; HUTSON, P. H. Hippocampal Bcl-2 expression is selectively increased following chronic but not acute treatment with antidepressants, 5-HT(1A) or 5-HT(2C/2B) receptor antagonists. **Eur J Pharmacol**, v. 569, n. 1-2, p. 41-7, 2007.
- NAKASO, K. *et al.* PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. **FEBS Lett**, v. 546, n. 2-3, p. 181-4, 2003.
- NEVE, K. A.; SEAMANS, J. K.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine receptor signaling. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 24, n. 3, p. 165-205, 2004.
- NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 284, n. 20, p. 13291-5, 2009.
- 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 Spectr**, v. 18, n. 5, p. 231-41, 2013.
- NIKOLETOPOULOU, V. *et al.* Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3448-59, 2013.
- NIMURA, T. *et al.* Heme oxygenase-1 (HO-1) protein induction in rat brain following focal ischemia. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 37, n. 1-2, p. 201-8, 1996.

- NISHI, M. *et al.* Direct visualization of glucocorticoid receptor positive cells in the hippocampal regions using green fluorescent protein transgenic mice. **Neuroscience**, v. 146, n. 4, p. 1555-60, 2007.
- NITTA, A. *et al.* beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. **Neurosci Lett**, v. 170, n. 1, p. 63-6, 1994.
- NOVOTNY, L. *et al.* Development of LC-MS method for determination of ursolic acid: application to the analysis of ursolic acid in *Staphylea holocarpa Hemsl.* **J Pharm Biomed Anal**, v. 31, n. 5, p. 961-8, 2003.
- NUTT, D. J. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 69 Suppl E1, p. 4-7, 2008.
- NYOLA, A. *et al.* Substrate and drug binding sites in LeuT. **Curr Opin Struct Biol**, v. 20, n. 4, p. 415-22, 2010.
- ONO, Y. *et al.* Imipramine protects mouse hippocampus against tunicamycin-induced cell death. **Eur J Pharmacol**, v. 696, n. 1-3, p. 83-8, 2012.
- OTTE, C. *et al.* Major depressive disorder. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16065, 2016.
- OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; SLAMENOVÁ, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutat Res**, v. 600, n. 1-2, p. 131-7, 2006.
- PACE, T. W.; HU, F.; MILLER, A. H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 1, p. 9-19, 2007.
- PALTA, P. *et al.* Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. **Psychosom Med**, v. 76, n. 1, p. 12-9, 2014.
- PANDEY, G. N. *et al.* Protein kinase C in the postmortem brain of teenage suicide victims. **Neurosci Lett**, v. 228, n. 2, p. 111-4, 1997.
- PARKER, P. J.; MURRAY-RUST, J. PKC at a glance. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 2, p. 131-2, Jan 2004.
- PAZINI, F. L. *et al.* Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 10, p. 6818-6834, 2016.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, 1977.

- PHILLIPS, C. *et al.* Neuroprotective effects of physical activity on the brain: a closer look at trophic factor signaling. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 170, 2014.
- PILC, A. *et al.* The effect of prolonged imipramine and electroconvulsive shock treatment on calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the hippocampus of rat brain. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 4, p. 597-603, 1999.
- PINTO BROD, L. M. *et al.* Modulation of PKA, PKC, CAMKII, ERK 1/2 pathways is involved in the acute antidepressant-like effect of (octylseleno)-xylofuranoside (OSX) in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 234, n. 4, p. 717-725, 2017.
- PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88-109, 2008.
- POON, I. K.; HULETT, M. D.; PARISH, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 3, p. 381-97, 2010.
- POPOLI, M. *et al.* Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs. **J Neurochem**, v. 74, n. 1, p. 21-33, 2000.
- POST, A. *et al.* Differential induction of NF-kappaB activity and neural cell death by antidepressants in vitro. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 12, p. 4331-7, 2000.
- PREDIGER, R. D. *et al.* Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 3, p. 465-73, 2008.
- QI, D. *et al.* HO-1 attenuates hippocampal neurons injury via the activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway in stroke. **Brain Res**, v. 1577, p. 69-76, 2014.
- QIAN, Z. *et al.* A phase I trial to evaluate the multiple-dose safety and antitumor activity of ursolic acid liposomes in subjects with advanced solid tumors. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 809714, 2015.
- QU, T., DENG, J., LI, R., CUI, Z., WANG, X., WANG, L., DENG, J. Stress injuries and autophagy in mouse hippocampus after chronic cold exposure. **Neural Regen Res**, v. 12, n. 3, p. 440-446, 2017.
- RAI, S. N. *et al.* Ursolic acid attenuates oxidative stress in nigrostriatal tissue and improves neurobehavioral activity in MPTP-induced Parkinsonian mouse model. **J Chem Neuroanat**, v. 71, p. 41-9, Jan 2016.

- RAJKOWSKA, G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. **Biol Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 766-770, Oct 2000.
- RAJKOWSKA, G. *et al.* Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 1085-98, 1999.
- RAJMOHAN, V.; MOHANDAS, E. The limbic system. **Indian J Psychiatry**, v. 49, n. 2, p. 132-9, 2007.
- REAGAN, L. P.; MCEWEN, B. S. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. **J Chem Neuroanat**, v. 13, n. 3, p. 149-67, 1997.
- REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505-11, 1985.
- RÉUS, G. Z. *et al.* Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 1, p. 166-71, 2011.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1458-61, 2006.
- RIEGER, D. K. *et al.* ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. **J Mol Recognit**, v. 27, n. 12, p. 746-54, 2014.
- ROBACZEWSKA, J. *et al.* Decreased expression of heme oxygenase is associated with depressive symptoms and may contribute to depressive and hypertensive comorbidity. **Redox Rep**, v. 21, n. 5, p. 209-18, 2016.
- RODRIGUES, A. L. *et al.* Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol**, v. 79, n. 3, p. 150-6, 1996.
- ROGATSKY, I.; TROWBRIDGE, J. M.; GARABEDIAN, M. J. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 6, p. 3181-93, 1997.
- ROLLINGER, J. M. *et al.* 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibiting constituents from *Eriobotrya japonica* revealed by bioactivity-guided isolation and computational approaches. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 4, p. 1507-15, Feb 2010.
- ROSA, D. V. *et al.* DARPP-32 expression in rat brain after electroconvulsive stimulation. **Brain Res**, v. 1179, p. 35-41, 2007.

- RÖSSLER, O. G.; GIEHL, K. M.; THIEL, G. Neuroprotection of immortalized hippocampal neurones by brain-derived neurotrophic factor and Raf-1 protein kinase: role of extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. **J Neurochem**, v. 88, n. 5, p. 1240-52, 2004.
- ROWE, E. J.; ORR, J. E. Isolation of oleanolic acid and ursolic acid from *Thymus vulgaris*, L. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, v. 38, n. 3 Pt. 1, p. 122-4, 1949.
- 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 Radic Biol Med**, v. 63, p. 187-94, 2013.
- SAMUELS, B. A.; HEN, R. Neurogenesis and affective disorders. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 6, p. 1152-9, Mar 2011.
- SAPOLSKY, R. M. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. **Biol Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 755-65, 2000.
- _____. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 1344-6, 2015.
- SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. **J Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 1222-7, 1985.
- SAPOLSKY, R. M.; PACKAN, D. R.; VALE, W. W. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. **Brain Res**, v. 453, n. 1-2, p. 367-71, 1988.
- SAPOLSKY, R. M. *et al.* Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. **J Neurosci**, v. 10, n. 9, p. 2897-902, 1990.
- SCAPAGNINI, G. *et al.* Antioxidants as antidepressants: fact or fiction? **CNS Drugs**, v. 26, n. 6, p. 477-90, 2012.
- SCAPAGNINI, G. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. **Mol Pharmacol**, v. 61, n. 3, p. 554-61, 2002.
- SCHAEFFER, H. J.; WEBER, M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 4, p. 2435-44, 1999.
- SCHAZ, U. *et al.* Dose-dependent modulation of apoptotic processes by fluoxetine in maturing neuronal cells: an in vitro study. **World J Biol Psychiatry**, v. 12, n. 2, p. 89-98, 2011.
- SCHIPPER, H. M. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. **Exp Gerontol**, v. 35, n. 6-7, p. 821-30, 2000.

_____. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 12, p. 1995-2011, 2004.

SCHIPPER, H. M.; SONG, W. A heme oxygenase-1 transducer model of degenerative and developmental brain disorders. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 3, p. 5400-19, 2015.

SCHMIDT, H. D.; BANASR, M.; DUMAN, R. S. Future Antidepressant Targets: Neurotrophic Factors and Related Signaling Cascades. **Drug Discov Today Ther Strateg**, v. 5, n. 3, p. 151-156, 2008.

SCHMIDT, S. *et al.* Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. **Cell Death Differ**, v. 11 Suppl 1, p. S45-55, 2004.

SCHOLZ, S.; WILLIAMSON, G. Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols *in vivo*. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 77, n. 3, p. 224-35, 2007.

SHANMUGAM, M. K. *et al.* Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. **Biochem Pharmacol**, v. 85, n. 11, p. 1579-87, 2013.

SHELINE, Y. I.; GADO, M. H.; KRAEMER, H. C. Untreated depression and hippocampal volume loss. **Am J Psychiatry**, v. 160, n. 8, p. 1516-8, 2003.

SHELINE, Y. I. *et al.* Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. **J Neurosci**, v. 19, n. 12, p. 5034-43, 1999.

SHELINE, Y. I. *et al.* Hippocampal atrophy in recurrent major depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 9, p. 3908-13, 1996.

SHELTON, R. C.; HAL MANIER, D.; LEWIS, D. A. Protein kinases A and C in post-mortem prefrontal cortex from persons with major depression and normal controls. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 12, n. 9, p. 1223-32, 2009.

SHEN, D. *et al.* A rapid LC/MS/MS method for the analysis of nonvolatile antiinflammatory agents from *Mentha* spp. **J Food Sci**, v. 76, n. 6, p. C900-8, 2011.

SHI, H. S. *et al.* PI3K/Akt signaling pathway in the basolateral amygdala mediates the rapid antidepressant-like effects of trefoil factor 3. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 12, p. 2671-83, 2012.

SHI, Y. *et al.* Genetic variation in the calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) pathway is associated with antidepressant response in females. **J Affect Disord**, v. 136, n. 3, p. 558-66, 2012.

- SHIH, Y. H. *et al.* Ursolic acid protects hippocampal neurons against kainate-induced excitotoxicity in rats. **Neurosci Lett**, v. 362, n. 2, p. 136-40, 2004.
- SHIN, T. K. *et al.* Fluoxetine and sertraline attenuate postischemic brain injury in mice. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 13, n. 3, p. 257-63, 2009.
- SILVA, M. T. *et al.* Prevalence of depression morbidity among Brazilian adults: a systematic review and meta-analysis. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 36, n. 3, p. 262-70, 2014.
- SINGH, R. *et al.* Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146110, 2016.
- SINGLA, R. K.; SCOTTI, L.; DUBEY, A. K. In silico studies revealed multiple neurological targets for the antidepressant molecule ursolic acid. **Curr Neuropharmacol**, 2016.
- SMITH, M. A. *et al.* Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 15, n. 3 Pt 1, p. 1768-77, 1995.
- SPIERS, J. G. *et al.* Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. **Front Neurosci**, v. 8, p. 456, 2014.
- STAHN, C.; BUTTGEREIT, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 4, n. 10, p. 525-33, 2008.
- STARKMAN, M. N. *et al.* Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. **Biol Psychiatry**, v. 46, n. 12, p. 1595-602, 1999.
- STEIN-BEHRENS, B. *et al.* Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 5373-80, 1994.
- STEIN, B. A.; SAPOLSKY, R. M. Chemical adrenalectomy reduces hippocampal damage induced by kainic acid. **Brain Res**, v. 473, n. 1, p. 175-80, 1988.
- STERU, L. *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.
- STEWART, C. R. *et al.* CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. **Nat Immunol**, v. 11, n. 2, p. 155-61, 2010.

SU, J. H.; DENG, G.; COTMAN, C. W. Bax protein expression is increased in Alzheimer's brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 56, n. 1, p. 86-93, 1997.

SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. **FEBS J**, v. 277, n. 1, p. 22-9, 2010.

SUN, Q. *et al.* Folate deprivation modulates the expression of autophagy- and circadian-related genes in HT-22 hippocampal neuron cells through GR-mediated pathway. **Steroids**, v. 112, p. 12-9, 2016.

SVENNINGSSON, P.; NAIRN, A. C.; GREENGARD, P. DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. **AAPS J**, v. 7, n. 2, p. E353-60, 2005.

SVENNINGSSON, P. *et al.* DARPP-32: an integrator of neurotransmission. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 269-96, 2004.

SVENNINGSSON, P. *et al.* Involvement of striatal and extrastriatal DARPP-32 in biochemical and behavioral effects of fluoxetine (Prozac). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 5, p. 3182-7, Mar 2002.

SWULIUS, M. T.; WAXHAM, M. N. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 17, p. 2637-57, 2008.

SZAKIEL, A.; PAĆZKOWSKI, C.; HUTTUNEN, S. Triterpenoid content of berries and leaves of bilberry *Vaccinium myrtillus* from Finland and Poland. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 48, p. 11839-49, 2012.

SZAKIEL, A. *et al.* Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. **Phytochem Rev**, v. 11, n. 2-3, p. 263-284, 2012.

TAKAHASHI, R. H.; NAGAO, T.; GOURAS, G. K. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. **Pathol Int**, 2017.

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

TANNOCK, L. R. Ursolic acid effect on atherosclerosis: apples and apples, or apples and oranges? **Atherosclerosis**, v. 219, n. 2, p. 397-8, 2011.

TAPONDJOU, L. A. *et al.* In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. **Arch Pharm Res**, v. 26, n. 2, p. 143-6, 2003.

TATTON, W. G. *et al.* Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. **Ann Neurol**, v. 53 Suppl 3, p. S61-70; discussion S70-2, 2003.

TAVIANO, M. F. *et al.* Ursolic acid plays a role in *Nepeta sibthorpii Benth*am CNS depressing effects. **Phytother Res**, v. 21, n. 4, p. 382-5, 2007.

TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **J Biol Chem**, v. 244, n. 23, p. 6388-94, 1969.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 148, p. 63-106, 2015.

TIRABOSCHI, E. *et al.* Antidepressants activate CaMKII in neuron cell body by Thr286 phosphorylation. **Neuroreport**, v. 15, n. 15, p. 2393-6, 2004.

TORRES, K. C. *et al.* The leukocytes expressing DARPP-32 are reduced in patients with schizophrenia and bipolar disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 214-9, 2009.

TRIVEDI, M. H. *et al.* Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. **N Engl J Med**, v. 354, n. 12, p. 1243-52, 2006.

TRONCOSO, R. *et al.* Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. **Cell Cycle**, v. 13, n. 14, p. 2281-95, 2014.

TSAI, S. J.; YIN, M. C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. **J Food Sci**, v. 73, n. 7, p. H174-8, 2008.

ULLEVIG, S. L. *et al.* Ursolic acid protects diabetic mice against monocyte dysfunction and accelerated atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 219, n. 2, p. 409-16, 2011.

UNO, H. *et al.* Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. **Horm Behav**, v. 28, n. 4, p. 336-48, 1994.

UNO, H. *et al.* Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. **J Neurosci**, v. 9, n. 5, p. 1705-11, 1989.

VAIDYA, V. A.; DUMAN, R. S. Depression--emerging insights from neurobiology. **Br Med Bull**, v. 57, p. 61-79, 2001.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (*Melastomataceae*). **Z Naturforsch C**, v. 61, n. 7-8, p. 477-82, 2006.

VERANO, J. *et al.* Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 110, p. 255-64, 2013.

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

VINET, J. *et al.* Chronic treatment with desipramine and fluoxetine modulate BDNF, CaMKKalpha and CaMKKbeta mRNA levels in the hippocampus of transgenic mice expressing antisense RNA against the glucocorticoid receptor. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 7, p. 1062-9, 2004.

VON GUNTEN, A. *et al.* A volumetric study of hippocampus and amygdala in depressed patients with subjective memory problems. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 12, n. 4, p. 493-8, 2000.

VYTHILINGAM, M. *et al.* Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 12, p. 2072-80, 2002.

WANG, Q. *et al.* Glucocorticoid receptor protein expression in human hippocampus; stability with age. **Neurobiol Aging**, v. 34, n. 6, p. 1662-73, 2013.

WANG, X. *et al.* Inhibition of Jun N-terminal kinase (JNK) enhances glucocorticoid receptor-mediated function in mouse hippocampal HT22 cells. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 242-9, 2005.

WANG, X. H. *et al.* Evaluation of toxicity and single-dose pharmacokinetics of intravenous ursolic acid liposomes in healthy adult volunteers and patients with advanced solid tumors. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 9, n. 2, p. 117-25, 2013.

WANG, Y.; HE, Z.; DENG, S. Ursolic acid reduces the metalloprotease/anti-metalloprotease imbalance in cerebral ischemia and reperfusion injury. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 1663-74, 2016.

WANG, Y. *et al.* Venlafaxine modulates depression-induced behaviour and the expression of Bax mRNA and Bcl-xl mRNA in both hippocampus and myocardium. **Hum Psychopharmacol**, v. 26, n. 2, p. 95-101, 2011.

WANG, Y. J. *et al.* Ursolic acid attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive deficits in mouse brain through suppressing p38/NF- κ B mediated inflammatory pathways. **Neurobiol Learn Mem**, v. 96, n. 2, p. 156-65, 2011.

WILKINSON, K. *et al.* A high content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid beta protein interactions with its receptor CD36. **J Biol Chem**, v. 286, n. 40, p. 34914-22, 2011.

WOZNIAK, L.; SKAPSKA, S.; MARSZALEK, K. Ursolic Acid--A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20614-41, 2015.

- WRANN, C. D. *et al.* Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway. **Cell Metab**, v. 18, n. 5, p. 649-59, 2013.
- WU, D. M. *et al.* Ursolic acid improves domoic acid-induced cognitive deficits in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 271, n. 2, p. 127-36, 2013.
- WUWONGSE, S. *et al.* Effects of corticosterone and amyloid-beta on proteins essential for synaptic function: implications for depression and Alzheimer's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 12, p. 2245-56, 2013.
- XIA, Y. *et al.* Quantitation of ursolic acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 2, p. 219-24, 2011.
- XIA, Z. *et al.* Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, v. 270, n. 5240, p. 1326-31, Nov 1995.
- XIE, H. *al.* In vitro inhibition of UGT1A3, UGT1A4 by ursolic and oleanolic acid and drug-drug interaction risk prediction. **Xenobiotica**, p. 1-28, 2016.
- XING, G. *et al.* Decreased prefrontal CaMKII alpha mRNA in bipolar illness. **Neuroreport**, v. 13, n. 4, p. 501-5, 2002.
- XU, C. *et al.* Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 8, p. 1918-26, 2006.
- XU, M. F. *et al.* Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in *Centella asiatica*, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 33, n. 5, p. 578-87, 2012.
- XU, Y. *et al.* Phosphodiesterase-2 inhibitor reverses corticosterone-induced neurotoxicity and related behavioural changes via cGMP/PKG dependent pathway. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 4, p. 835-47, 2013.
- XU, Y. *et al.* Corticosterone induced morphological changes of hippocampal and amygdaloid cell lines are dependent on 5-HT7 receptor related signal pathway. **Neuroscience**, v. 182, p. 71-81, 2011.
- YAKOVLEV, A. G.; FADEN, A. I. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 5-16, 2004.
- YAN, Z. *et al.* D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein

- phosphorylation in neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 20, p. 11607-12, 1999.
- YANG, L. *et al.* Neuroprotective effects of the triterpenoid, CDDO methyl amide, a potent inducer of Nrf2-mediated transcription. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5757, 2009.
- YANG, T. *et al.* Regulation on Beclin-1 expression by mTOR in CoCl₂-induced HT22 cell ischemia-reperfusion injury. **Brain Res**, v. 1614, p. 60-6, Jul 2015.
- YAROSH, D. B.; BOTH, D.; BROWN, D. Liposomal ursolic acid (merotaine) increases ceramides and collagen in human skin. **Horm Res**, v. 54, n. 5-6, p. 318-21, 2000.
- YAU, J. L.; SECKL, J. R. Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. **Front Aging Neurosci**, v. 4, p. 24, 2012.
- YEALLAND, G. *et al.* Rescue of mitochondrial function in parkin-mutant fibroblasts using drug loaded PMPC-PDPA polymersomes and tubular polymersomes. **Neurosci Lett**, v. 630, p. 23-9, 2016.
- YGER, M.; GIRAULT, J. A. DARPP-32, Jack of All Trades... Master of Which? **Front Behav Neurosci**, v. 5, p. 56, 2011.
- YOON, J. H. *et al.* p-Coumaric acid and ursolic acid from *Corni fructus* attenuated β -amyloid(25-35)-induced toxicity through regulation of the NF- κ B signaling pathway in PC12 cells. **J Agric Food Chem**, v. 62, n. 21, p. 4911-6, 2014.
- YOUDIM, M. B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 295-309, 2006.
- YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 1, p. 47-59, 2008.
- YOUN, K.; JUN, M. Inhibitory effects of key compounds isolated from *Corni fructus* on BACE1 Activity. **Phytother Res**, v. 26, n. 11, p. 1714-8, 2012.
- YOUNG, E. A. *et al.* HPA axis activation in major depression and response to fluoxetine: a pilot study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 9, p. 1198-204, 2004.
- YOUNG, E. A. *et al.* Increased evening activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in depressed patients. **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, n. 9, p. 701-7, 1994.
- YOUNG, L. T. Neuroprotective effects of antidepressant and mood stabilizing drugs. **J Psychiatry Neurosci**, v. 27, n. 1, p. 8-9, 2002.

YU, F. *et al.* Functional characterization of amyrin synthase involved in ursolic acid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaf epidermis.

Phytochemistry, v. 91, p. 122-7, 2013.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 220-8, 2009.

ZEMBRUSKI, N. C. *et al.* 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Anal Biochem**, v. 429, n. 1, p. 79-81, 2012.

ZENI, A. L. *et al.* Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 181-6, 2012.

ZEYNALOV, E. *et al.* Heme oxygenase 1 is associated with ischemic preconditioning-induced protection against brain ischemia. **Neurobiol Dis**, v. 35, n. 2, p. 264-9, 2009.

ZHANG, C. *et al.* Influence of BCL2 gene in major depression susceptibility and antidepressant treatment outcome. **J Affect Disord**, v. 155, p. 288-94, 2014.

ZHANG, F. *et al.* Pharmacological induction of heme oxygenase-1 by a triterpenoid protects neurons against ischemic injury. **Stroke**, v. 43, n. 5, p. 1390-7, 2012.

ZHANG, L. *et al.* Protein kinase A inhibitor, H89, enhances survival and clonogenicity of dissociated human embryonic stem cells through Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) inhibition. **Hum Reprod**, v. 31, n. 4, p. 832-43, 2016.

ZHANG, T. *et al.* Ursolic acid alleviates early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage by suppressing TLR4-mediated inflammatory pathway. **Int Immunopharmacol**, v. 23, n. 2, p. 585-91, 2014.

ZHANG, T. *et al.* Ursolic acid reduces oxidative stress to alleviate early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage. **Neurosci Lett**, v. 579, p. 12-7, 2014.

ZHANG, W. H. *et al.* Nortriptyline protects mitochondria and reduces cerebral ischemia/hypoxia injury. **Stroke**, v. 39, n. 2, p. 455-62, 2008.

ZHANG, X.; LIU, Q. Autophagy Assays (LC3B immunofluorescence, LC3B western blot, acridine orange assay). **Bio-protocol**, v. 3, n. 24, p. e1012, 2013.

ZHANG, X. *et al.* Participation of protein kinase C in the activation of Nrf2 signaling by ischemic preconditioning in the isolated rabbit heart. **Mol Cell Biochem**, v. 372, n. 1-2, p. 169-79, 2013.

- ZHANG, Y. *et al.* Ursolic acid prevents augmented peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in high-fat diet-induced obese rats by restoring downregulated spinal PPAR α . **Mol Med Rep**, v. 13, n. 6, p. 5309-16, 2016.
- ZHAO, Q. *et al.* Protection against MPP(+)-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells by tormentic acid via the activation of PI3-K/Akt/GSK3 β pathway. **Neurochem Int**, v. 97, p. 117-23, 2016.
- ZHENG, X. Y. *et al.* Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 457079, 2011.
- ZHENG, Y. *et al.* Corticosterone increases intracellular Zn(2+) release in hippocampal HT-22 cells. **Neurosci Lett**, v. 588, p. 172-7, 2015.
- ZHONG, J. J.; YUE, C. J. Plant cells: secondary metabolite heterogeneity and its manipulation. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 100, p. 53-88, 2005.
- ZHOU, H.; LI, X.; GAO, M. Curcumin protects PC12 cells from corticosterone-induced cytotoxicity: possible involvement of the ERK1/2 pathway. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, n. 3, p. 236-40, 2009.
- ZHOU, J. *et al.* Crosstalk Between MAPK/ERK and PI3K/AKT Signal Pathways During Brain Ischemia/Reperfusion. **ASN Neuro**, v. 7, n. 5, 2015.
- ZHU, Z. *et al.* A phase I pharmacokinetic study of ursolic acid nanoliposomes in healthy volunteers and patients with advanced solid tumors. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 129-36, 2013.
- ZOU, Y. *et al.* Apelin-13 Protects PC12 Cells from Corticosterone-Induced Apoptosis Through PI3K and ERKs Activation. **Neurochem Res**, v. 41, n. 7, p. 1635-44, 2016.
- ZSCHOCKE, J. *et al.* Antidepressant drugs diversely affect autophagy pathways in astrocytes and neurons--dissociation from cholesterol homeostasis. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 8, p. 1754-68, 2011.

12. APÊNDICE

Tabela 2: Anticorpos utilizados nesta Tese

Nome	Clonal	kDa	Goat	Empresa	Código	Diluição
anti-fosfo DARPP-32 Thr75	monoclonal	32	rabbit	Novus biologicals	NG100-9517	1/5000
anti-total DARPP-32	monoclonal	32	rabbit	Abcam	ab40801	1/20000
anti- β -actina	monoclonal	43	mouse	Santa cruz	sc-47778	1/2000
anti HO-1	monoclonal	32	mouse	Santa cruz	sc-390991	1/500
anti-mouse IgG conjugado HRP	policlonal	43	mouse	Millipore	AP308P	1/2500
anti-pP38	monoclonal	38	rabbit	Millipore	05-1059	1/10000
anti-tP38	policlonal	38	rabbit	Sigma	M0800	1/10000
anti-pJNK1/2	policlonal	46-55	rabbit	Cell signaling	#9251S	1/1000
anti-tJNK1/2	policlonal	46-55	rabbit	Sigma	J4500	1/1000
anti-pERK1/2	monoclonal	44-42	mouse	Sigma	M8159	1/5000
anti-tERK1/2	monoclonal	44-42	rabbit	Sigma	M5670	1/20000
anti-rabbit IgG conjugado HRP	policlonal	43	rabbit	Millipore	AP132P	1/2500

13. ANEXO

Protocolo CEUA para as metodologias in vivo empregadas nesta Tese

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00795

Título

Metodologias utilizadas no laboratório de Neurobiologia da Depressão para ensaios in vivo.

Data de Entrada

17/05/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

26/07/2012

Considerações

Ofício nº 62/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues, Departamento de Bioquímica - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade o presidente da CEUA-UFSC deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no protocolo e corrigidos na carta anexa estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: sete mil camundongos (*Mus musculus*) e duzentos e cinquenta ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 26/10/2016

Data 26/07/2012

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE