



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

Isabella Aparecida Heinrich

**MODULAÇÃO SINÁPTICA DA SUBUNIDADE GLUA4 DO RECEPTOR AMPA E  
DA PENTRAXINA REGULADA PELA ATIVIDADE NEURONAL (NARP) NA  
DEPRESSÃO E NA EPILEPSIA**

Florianópolis  
2021



Isabella Aparecida Heinrich

**MODULAÇÃO SINÁPTICA DA SUBUNIDADE GLUA4 DO RECEPTOR AMPA E  
DA PENTRAXINA REGULADA PELA ATIVIDADE NEURONAL (NARP) NA  
DEPRESSÃO E NA EPILEPSIA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em  
Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do título de Doutor em Neurociências  
Orientador: Prof. Rodrigo Bainy Leal, Dr.  
Coorientadora: Andiará Espíndola de Freitas, Dra.

Florianópolis

2021

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

Heinrich, Isabella Aparecida  
Modulação sináptica da subunidade GluA4 do receptor AMPA  
e da pentraxina regulada pela atividade neuronal (Narp) na  
depressão e na epilepsia / Isabella Aparecida Heinrich ;  
orientador, Rodrigo Bainy Leal, coorientador, Andiara  
Espíndola de Freitas, 2021.  
111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. GluA4. 3. Narp. 4. Depressão. 5.  
Epilepsia. I. Bainy Leal, Rodrigo. II. Espíndola de  
Freitas, Andiara. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV.  
Título.

Isabella Aparecida Heinrich

**Modulação sináptica da subunidade GluA4 do receptor AMPA e da pentraxina regulada pela atividade neuronal (Narp) na depressão e na epilepsia**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Leandra Celso Constantino, Dra.  
Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino

Prof. Marcelo Farina, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Neurociências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Rodrigo Bainy Leal, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2021.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Rodrigo Bainy Leal por me permitir desenvolver este trabalho! Por me acolher e me incentivar! Por toda a empatia, amizade, conselhos profissionais e pessoais!... e não menos importante, por ser anfitrião dos melhores churrascos haha! Sentirei saudades de ti, prof Rodrigo! ...intelectual, sempre com ensinamentos diários não só de ciências biológicas, mas também política, culinária, gestão, consertos, economia, arte, história do Brasil e por aí vai!... sempre com observações sábias e ditados pertinentes como “o olho do dono é que engorda o boi” hahaha... Lembrarei para sempre das suas frases e ensinamentos!! Com certeza esses 8 anos de convivência contribuíram muito para a minha formação pessoal e profissional! Serei eternamente grata por tudo que me proporcionastes!

À minha coorientadora Andiará, mulher forte, determinada, caprichosa!... com uma capacidade incrível de conciliar várias demandas diferentes realizando tudo muito bem! Aprendi muito contigo, amiga! Agradeço por ter colaborado tanto com os meus resultados e pela parceria de sempre! Foi um enorme prazer dividir a bancada com você!

Aos companheiros do laboratório Neuroquímica 3 pela parceria e convivência.

Aos demais laboratórios, colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço também aos colegas de outros departamentos e cursos pelo *networking* extremamente significativo na minha vida! Rendeu colaborações incríveis, aprendizados, produtos! Estabelecemos redes frutuosas sólidas que felizmente se propagam!

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, por promoverem um ambiente fecundo de estudo e trabalho.

A todos os meus amigos!... Gratidão pela rede de apoio que formamos, pelas angústias partilhadas, alegrias compartilhadas e energias positivas reverberadas!

À toda minha família, com muito carinho!... e, em especial, ao meu parceiro da vida, meu noivo, meu melhor amigo, meu cúmplice, meu porto seguro: Vinicius. Agradeço imensamente por todo o amor!

A todos que me querem bem, que torceram e torcem por mim, meu muito obrigada!!!

*“To know the brain ... is equivalent to  
ascertaining the material course of thought  
and will, to discovering the intimate history of  
life in its perpetual duel with external forces.”*

*Santiago Ramón y Cajal*

## RESUMO

Narp (pentraxina regulada pela atividade neuronal) é uma proteína expressa no sistema nervoso central de mamíferos que atua na modulação da plasticidade sináptica através da modulação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. Narp pode participar na modulação fisiológica da atividade de interneurônios Gabaérgicos e tem sido implicada na fisiopatologia de diversas neuropatologias, incluindo epilepsia e transtorno depressivo maior. Drogas que atuam no sistema monoaminérgico podem regular o sistema glutamatérgico e, por isso, a investigação de proteínas associadas a esse sistema, como a Narp e a subunidade GluA4 do receptor AMPA, pode revelar modulações pouco exploradas desencadeadas por antidepressivos convencionais ou pela epilepsia, por exemplo. Inicialmente, este estudo teve como objetivo caracterizar os mecanismos neuroquímicos relacionados a modulação de Narp e GluA4 subjacentes ao tratamento agudo com compostos com atividade antidepressiva, como cetamina e a lectina ConBr, bem como frente ao tratamento crônico com fluoxetina, avaliando esses alvos proteicos no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos. A administração aguda de cetamina 1 mg/kg (i.p.) e ConBr 10 µg/sítio (i.c.v.) bem como a administração crônica (21 dias) de fluoxetina 1 e 10 mg/kg (p.o.) foram eficazes na ação antidepressiva, pois reduziram o tempo de imobilidade no TNF, sem alterar a atividade locomotora no TCA. Não foram observadas alterações na modulação das proteínas analisadas por Western blot 8h, 18h e 24h após o tratamento agudo com cetamina e ConBr. Em contraste, foi observado que o tratamento crônico com fluoxetina 10 mg/kg promoveu aumento da fosforilação de CREB e expressão de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo. Além disso, no hipocampo, a fluoxetina induziu ativação de AKT e aumentou a expressão de Narp. No córtex pré-frontal, uma diminuição significativa na expressão da subunidade GluA4 e Narp foi observada após o tratamento crônico de fluoxetina (10 mg/kg). Esses resultados fornecem evidências de novos alvos moleculares potencialmente envolvidos nos efeitos antidepressivos da fluoxetina, uma vez que em roedores adultos Narp e GluA4 são expressos principalmente nas conexões sinápticas com interneurônios GABAérgicos positivos para parvalbumina (PV+). Outro objetivo desse trabalho foi determinar a distribuição das proteínas Narp, GluA4 juntamente com CREB, BDNF, TrkB e calcineurina no córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de humanos, bem como verificar a modulação dessas proteínas por dexametasona. As amostras foram obtidas de pacientes humanos acometidos de epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose hipocampal (ELTM-EH) submetidos ao tratamento cirúrgico. Os resultados indicaram que o conteúdo relativo da proteína Narp é maior no HIP do que no CTX e AMG. Com relação à subunidade GluA4, seu conteúdo e nível de fosforilação total são maiores no CTX do que na AMG e HIP. Entretanto, a taxa de fosforilação de GluA4 é maior no CTX e AMG do que no HIP. Também foram investigadas outras proteínas-chave na neuroplasticidade como CREB, BDNF, TrkB e calcineurina. Apesar de não terem sido encontradas diferenças no conteúdo total, taxa de fosforilação e nível de fosforilação da proteína CREB, o conteúdo relativo de BDNF é maior na AMG em relação ao HIP. Quanto ao TrkB, o conteúdo total e o nível de fosforilação são bem maiores no CTX do que na AMG e HIP, enquanto a taxa de fosforilação de TrkB encontra-se aumentada na AMG, em comparação com as outras estruturas. Por fim, o conteúdo relativo de calcineurina é maior no CTX desses pacientes. Quando analisamos os efeitos da dexametasona, observamos aumento na taxa de fosforilação de GluA4 e na expressão de Narp no HIP de pacientes com ELTM-EH que receberam DEXA. Além disso, também foi observado no HIP de pacientes que receberam dexametasona aumento no imunoc conteúdo de CREB acompanhado de uma diminuição na taxa de fosforilação dessa proteína. No CTX e AMG não foram encontradas alterações. Em conjunto, todas as modulações neuroquímicas determinadas

nessas regiões cerebrais específicas e os efeitos de DEXA sobre os alvos estudados levantam a possibilidade de que Narp e GluA4 poderiam participar na fisiopatologia da epilepsia e especialmente podem ser alvos envolvidos na resposta à corticosteroides e eventualmente ao estresse, sugerindo a necessidade de estudos adicionais com essa abordagem. Em conjunto este trabalho contribui para o entendimento dos elementos moleculares envolvidos na ação antidepressiva da fluoxetina em um modelo animal, bem como traz uma descrição inicial do perfil de alguns parâmetros neuroquímicos em diferentes estruturas cerebrais de pacientes com ELTM-EH. Além disso, indica uma possível modulação de Narp e GluA4 em resposta aos corticosteroides em humanos.

**Palavras-chave:** GluA4. Narp. Depressão. Epilepsia. Dexametasona.

## ABSTRACT

Narp (neuronal activity-regulated pentraxin) is a protein expressed in the central nervous system of mammals that acts to modulate synaptic plasticity through the modulation of AMPA-type glutamatergic receptors. Narp may participate in the physiological modulation of GABAergic interneurons activity and has been implicated in the pathophysiology of several neuropathologies, including epilepsy and major depressive disorder. Drugs acting on the monoaminergic system can regulate the glutamatergic system and, therefore, the investigation of proteins associated with this system, such as Narp and the GluA4 subunit of the AMPA receptor, may reveal poorly explored modulations triggered by conventional antidepressants or by epilepsy, for example. Our study aimed to characterize the neurochemical mechanisms related to Narp and GluA4 modulation underlying acute treatment with compounds with antidepressant activity, such as ketamine and ConBr, as well as against chronic treatment with fluoxetine, evaluating these protein targets in the pre- frontal and hippocampus of mice. The acute administration of ketamine 1 mg/kg (ip) and ConBr 10 µg/site (icv) as well as the chronic administration (21 days) of fluoxetine 1 and 10 mg/kg (po) were effective in the antidepressant action, as they reduced the immobility time in TNF, without altering locomotor activity in OF. No alterations were observed in the modulation of proteins analyzed by Western blot 8h, 18h and 24h after acute treatment with ketamine and ConBr. In contrast, it was observed that chronic treatment with 10 mg/kg fluoxetine promoted increased CREB phosphorylation and BDNF expression in the prefrontal cortex and hippocampus. Furthermore, in the hippocampus, fluoxetine induced AKT activation and increased Narp expression. In the prefrontal cortex, a significant decrease in the expression of the GluA4 and Narp subunit was observed after chronic treatment with fluoxetine (10 mg/kg). These results provide evidence of new molecular targets potentially involved in the antidepressant effects of fluoxetine, since in adult rodents Narp and GluA4 are mainly expressed in synaptic connections with GABAergic interneurons positive for parvalbumin (PV+). Another objective of this work was to determine the distribution of proteins Narp, GluA4 together with CREB, BDNF, TrkB and calcineurin in the cortex (CTX), amygdala (AMG) and hippocampus (HIP) of humans, as well as to verify the modulation of these proteins by dexamethasone. Samples were obtained from human patients with mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (ELTM-EH) undergoing surgical treatment. The results indicated that the relative content of Narp protein is higher in HIP than in CTX and AMG. Regarding the GluA4 subunit, its content and level of total phosphorylation are higher in CTX than in AMG and HIP. However, the phosphorylation rate of GluA4 is greater in CTX and AMG than in HIP. Other key proteins involved in neuroplasticity such as CREB, BDNF, TrkB and calcineurin were also investigated. Although the total content, phosphorylation rate and total phosphorylation level of CREB were not different between HIP, CTX and AMG, the relative content of BDNF was higher in AMG compared to HIP. Concerning TrkB, the total content and level of phosphorylation was much higher in CTX than in AMG and HIP, while the phosphorylation rate of TrkB was higher in AMG, compared to the other structures. Finally, the relative content of calcineurin was higher in the CTX of these patients. When we analyzed the effects of dexamethasone, we observed an increase in the rate of phosphorylation of GluA4 and in the expression of Narp in the HIP of patients with ELTM-EH who received DEXA. Furthermore, an increase in the immunoccontent of CREB accompanied by a decrease in the rate of phosphorylation of this protein was also observed in the HIP of patients who received dexamethasone. In CTX and AMG no changes were found. Together, all neurochemical parameters determined in these specific brain regions and the effects of DEXA raise the possibility that Narp and GluA4 could participate in the pathophysiology of epilepsy and

especially might be targets involved in the response to corticosteroids and eventually to stress, suggesting that further studies will be necessary. Together, this work contributes to the understanding of the molecular elements involved in the antidepressant action of fluoxetine in an animal model, as well as bring an initial description of the profile for some neurochemical parameters in different brain structures from ELTM-EH patients. Moreover, it indicates a possible modulation of Narp and GluA4 in response to corticosteroids in humans.

**Keywords:** GluA4. Narp. Depression. Epilepsy. Dexamethasone

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema de uma subunidade do receptor AMPA (AMPA).....	25
Fig. 2 Os domínios C-terminal permitem a regulação específica da subunidade dos AMPAR.....	26
Fig. 3 Locais de fosforilação das subunidades do AMPAR.....	29
Fig. 4 Pentraxinas neuronais. ....	30
Fig. 5 Pentraxinas exercem controle bifuncional nas sinapses. ....	31
Fig. 6 O BDNF regula Narp para mediar a transmissão glutamatérgica.....	34
Fig. 7 Representação esquemática dos grupos experimentais para teste das vias de administração e veículos.....	41
Fig. 8 Representação esquemática dos grupos experimentais do tratamento agudo..	42
Fig. 9 Representação esquemática dos grupos experimentais do tratamento crônico com fluoxetina. ....	43
Fig. 10 Western blot representativo de Narp em diferentes espécies.....	47
Fig. 11 O grupo <i>sham</i> e os grupos tratados com veículo não apresentaram diferenças nem no TNF nem no TCA.....	49
Fig. 12 O tratamento agudo com cetamina, assim como com ConBr produz um efeito tipo antidepressivo no TNF. ....	50
Fig. 13 A modulação de Narp e GluA4 após tratamento agudo com cetamina e com ConBr. ....	51
Fig. 14 A expressão de Narp após tratamento de 8, 18 e 24h com cetamina e com ConBr. ....	53
Fig. 15 A fosforilação de GluA4 após tratamento de 8, 18 e 24h com cetamina e com ConBr. ....	55
Fig. 16 O tratamento crônico com fluoxetina produz um efeito tipo antidepressivo no TNF.....	56
Fig. 17 O tratamento crônico com fluoxetina diminui a expressão de GluA4.....	58
Fig. 18 O efeito do tratamento crônico com fluoxetina na modulação de Narp. ....	59
Fig. 19 O tratamento crônico com fluoxetina aumenta a fosforilação de CREB e BDNF. ....	60
Fig. 20 A fosforilação de AKT e ERK1/2 após tratamento crônico com fluoxetina. ....	62

Fig. 21 Representação esquemática do protocolo experimental e principais resultados. .....	63
Fig. 22 Ilustração esquemática da modulação dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico após tratamento crônico com fluoxetina (21 dias).....	69
Fig. 23 Modulação de Narp em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. ....	79
Fig. 24 Modulação de GluA4 em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. ....	80
Fig. 25 . Modulação de CREB e BDNF em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. ....	81
Fig. 26 Modulação de GluA4 em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. ....	82
Fig. 27 Modulação de Calcineurina em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. ....	83
Fig. 28 Representação esquemática dos principais resultados. As amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) foram coletadas e as análises bioquímicas realizadas posteriormente. ....	84

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Anticorpos utilizados no estudo com amostras de roedores.....	46
Quadro 2. Anticorpos utilizados no estudo com amostras de humanos.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Modulação das proteínas no córtex, amígdala e hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial tratados cirurgicamente que receberam ou não tratamento com dexametasona (DEXA).....	85
Tabela 2 Variáveis clínicas, cirúrgicas, demográficas, neurorradiológicas, neurofisiológicas de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial tratados cirurgicamente que receberam ou não tratamento com dexametasona (DEXA).....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEBSF Cloridrato de fluoreto 4-(2aminoetil) benzenossulfonilo  
AKT Proteína cinase B  
AMPA Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico  
AMPA Receptor AMPA  
ANOVA Análise de variância  
BDNF Fator neurotrófico derivado do encéfalo  
BSA Albumina do soro bovino  
Ca<sup>2+</sup> Cálcio  
CAMKII Proteína cinase cálcio calmodulina-dependente II  
CEPESC Centro de Epilepsia do Estado de Santa Catarina  
CPF Córtex pré-frontal  
CREB Elemento de resposta ao monofosfato de adenosina-cíclico  
DAEs Drogas antiepilépticas  
DO Densidade óptica  
ECS *Electroconvulsive seizures* ou crises eletroconvulsivas  
EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELT Epilepsia do lobo temporal  
ELTM-EH Epilepsia do lobo temporal mesial associada a esclerose do hipocampo  
EPM Erro padrão da média  
ERK Cinase regulada por sinal extracelular  
FLX Fluoxetina  
GABA Ácido g-aminobutírico  
GCs Glicocorticoides  
GluA4 Subunidade GluA4 do receptor AMPA  
HIP Hipocampo  
HU Hospital Universitário  
IEG *Immediate early gene* ou gene de expressão imediata  
ISRS Inibidores seletivos da recaptção de serotonina  
i.v. Intravenoso  
LTD Depressão de longa duração  
LTP Potenciação de longa duração

M Molar  
mM Milimolar  
MAPK Proteína cinase ativa por mitógeno  
mRNA Ácido ribonucléico mensageiro  
mTOR Proteína alvo da rapamicina em mamíferos  
Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> Ortovanadato de sódio  
NaF Fluoreto de sódio  
NMDA N-metil-D-aspartato  
PI3K Fosfatidilinositol-3-cinase  
PMSF Fluoreto de Fenilmetilsulfonil  
PKA Proteína cinase A  
*p.o. per oralis*  
PKC Proteína cinase C  
PV Parvoalbumina  
RNA Ácido ribonucléico  
RNAm RNA mensageiro  
SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
SDS Dodecil sulfato de sódio  
SNC Sistema nervoso central  
TACE Enzima conversora de TNF- $\alpha$   
TBS-T Solução salina tamponada com Tris e Tween  
TBS Solução salina tamponada com Tris  
TCA Teste do campo aberto  
TDM Transtorno depressivo maior  
TNF Teste do nado forçado  
TNF- $\alpha$  Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
TrkB Receptor tropomiosina cinase B  
mg Miligrama  
mL Mililitro  
 $\mu$ g Micrograma  
 $\mu$ L Microlitro

### Artigo científico da tese

1. **HEINRICH, I. A.**; FREITAS, A. E.; WOLIN, I. A. V.; NASCIMENTO, A. P. M.; WALZ, R.; RODRIGUES, A. L. S.; LEAL, R. Neuronal activity regulated pentraxin (Narp) and GluA4 subunit of AMPA receptor may be targets for fluoxetine modulation. *Metabolic Brain Disease.*, v.36, p.711 - 722, **2021**.

### Outros artigos científicos publicados em periódicos

2. RIEGER, D.K.; NAVARRO, E.; BUENDIA, I.; PARADA, E.; GONZÁLEZ-LAFUENTE, L.; LEON, R.; COSTA, A.P.; **HEINRICH, I.A.**; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LOPEZ, M.G.; EGEEA, J.; LEAL, R.B. ConBr, A Lectin Purified from the Seeds of *Canavalia brasiliensis*, Protects Against Ischemia in Organotypic Culture of Rat Hippocampus: Potential Implication of Voltage-Gated Calcium Channels. *NEUROCHEMICAL RESEARCH*, v. 1, p. 1-13, **2016**.
3. NASCIMENTO, K.S.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; MARTINS, F.W.V.; NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN, I.A.; **HEINRICH, I.A.**; MARTINS, M.G.Q.; SILVA, M.T.L.; LOSSIO, C.F.; ROCHA, C.R.C.; LEAL, R.B.; CAVADA, B.S. Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: a C6 cells apoptosis-inducing protein. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY*, v. 92, p. 79-89, **2017**.
4. GONÇALVES, F.M.; NEIS, V.B.; RIEGER, D.K.; PERES, T.V.; LOPES, M.W.; **HEINRICH, I.A.**; COSTA, A.P.; RODRIGUES, A.L.S.; KASTER, M.P.; LEAL, R.B. Glutamatergic system and mTOR-signaling pathway participate in the antidepressant-like effect of inosine in the tail suspension test. *JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION*, v. 124, p. 1227-1237, **2017**.
5. GONÇALVES, F.M.; NEIS, V.B.; RIEGER, D.K.; LOPES, M.W.; **HEINRICH, I.A.**; COSTA, A.P.; RODRIGUES, A.L.S.; KASTER, M.P.; LEAL, R.B. Signaling pathways underlying the antidepressant-like effect of inosine in mice. *PURINERGIC SIGNALING*, v. 13, p. 203-214, **2017**.
6. NASCIMENTO, A.P.M.; KNAUT, J.L.; RIEGER, D.K.; WOLIN, I.; **HEINRICH, I.A.**; MANN, J.; JUAREZ, A.V.; SOSA, L. DEL V.; DE PAUL, A.L.; MOREIRA, C.G.; SILVA, I.B.; NOBRE, C.A.S.; OSTERNE, V.J.S.; NASCIMENTO, K.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, v. 120, p. 566-577, **2018**.
7. NEIS, V.B.; BETTIO, L.E.; MORETTI, M.; ROSA, P.B.; OLESCOWICZ, G.; FRAGA, D.B.; GONÇALVES, F.M.; FREITAS, A.E.; **HEINRICH, I.A.**; LOPES, M.W.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A.L.S. Single administration of agmatine reverses the depressive-like behavior induced by corticosterone in mice: comparison with ketamine and fluoxetine. *PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR*, v.173, p.44-50, **2018**.

8. TAVARES, M.K.; DOS REIS, S.; PLATT, N.; **HEINRICH, I. A.**; WOLIN, I.A.V.; LEAL, R.B.; KASTER, M.P.; RODRIGUES, A.L.S.; FREITAS, A.E. Agmatine potentiates neuroprotective effects of subthreshold concentrations of ketamine via mTOR/S6 kinase signaling pathway. *NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL*, v. 118, p. 275-285, **2018**.
9. CAVADA, B.S.; SILVA, M.T.L.; OSTERNE, V.J.S.; PINTO-JUNIOR, V.R.; NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN, I.A.V.; **HEINRICH, I.A.**; NOBRE, C.A.S.; MOREIRA, C.G.; LOSSIO, C.F.; ROCHA, C.R.C.; MARTINS, J.L.; NASCIMENTO, K.S.; LEAL, R.B. Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, v. 106, p. 369-378, **2018**.
10. NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN, I.A.V.; WELTER, P.; **HEINRICH, I.A.**; ZANOTTO-FILHO, A.; OSTERNE, V.J.S.; LOSSIO, C.F.; SILVA, M.T.L.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Lectin from Dioclea violacea induces autophagy in U87 glioma cells. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, v. 134, p. 660-672, **2019**.
11. ALMEIDA, G. R. L.; SZCEPANIK, J. C.; SELHORST, I.; SCHMITZ, A. E.; SANTOS, B.; CUNHA, M. P.; **HEINRICH, I. A.**; PAULA, G. C.; BEM, A. F.; LEAL, R. B.; DAFRE, A. L. Methylglyoxal-Mediated Dopamine Depletion, Working Memory Deficit, and Depression-Like Behavior Are Prevented by a Dopamine/Noradrenaline Reuptake Inhibitor. *MOLECULAR NEUROBIOLOGY*, p.1 - 15, **2020**.
12. FREITAS, A. E.; **HEINRICH, I. A.**; MOURA, T. M.; FRAGA, D. B.; COSTA, A. P.; AZEVEDO, D.; BROCARDO, P. S.; KASTER, M. P.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. S. Agmatine potentiates antidepressant and synaptic actions of ketamine: Effects on dendritic arbors and spines architecture and AKT/S6 kinase signaling. *EXPERIMENTAL NEUROLOGY*, v.333, p.113398 -, **2020**.
13. WOLIN, I. A. V.; **HEINRICH, I. A.**; NASCIMENTO, A. P. M.; WELTER, P. G.; SOSA, L. V.; DE PAUL, ANA LUCIA; ZANOTTO-FILHO, A.; NEDEL, C. B.; LIMA, L. D.; OSTERNE, V. J. S.; REIS JUNIOR, V. P.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LEAL, R. B. ConBr lectin modulates MAPKs and AKT pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. *BIOCHIMIE*, v.180, p.186 - 204, **2021**.
14. ROSA, P. B.; BETTIO, L. E.; NEIS, V. B.; MORETTI, M.; KAUFMANN, F. N.; KRUGER, M.; WERLE, I.; DALSENTER, Y.; PLATT, N.; ROSADO, A. F.; FRAGA, D.; **HEINRICH, I. A.**; RODRIGUES, A. L. S.; LEAL, R. B. Antidepressant-like effect of guanosine involves activation of AMPA receptor and BDNF/TrkB signaling. *Purinergic Signalling*, v.17, p.285 - 301, **2021**.

#### Capítulos de livro publicados

15. FREITAS, A.E. & **HEINRICH, I.A.** Ketamine, Fast-Acting Antidepressant and Synaptic Effects: An Overview. In: Leland A. McBride. (Org.). Ketamine: History, Uses and Health Effects. 1ed.: *Nova Medicine and Health*, **2020**, p. 1-20.

## Resumos publicados em anais de eventos

16. SOSA, L.V.; **HEINRICH, I.A.**; ZLOCOWSKI, N.; PICECH, F.; GUIDO, C.; GUTIERREZ, S.; PETITI, J.P.; LEAL, R.B.; PAUL, A.; TORRES, A. FGF2-induced adenohipofisary cell proliferation is regulated by inhibitory GPCR. In: Reuni3n Conjunta de Sociedades de Biociencias, v.77, Buenos Aires. Medicina, 2017.
17. NEIS, V.B.; MORETTI, M.; ROSA, P.B.; OLESCOWICZ, G.; FRAGA, D.B.; GONCALVES, F.M.; FREITAS, A.E.; **HEINRICH, I.A.**; LOPES, M.W.; LEAL, R.B.; RODRIGUES, A.L.S. A single administration of agmatine, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic administration of corticosterone in mice. In: 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC. *47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*, 2017.
18. WOLIN, I.A.V.; NASCIMENTO, A.P.M.; **HEINRICH, I.A.**; WELTER, P.G.; MANN, J.; PINTO-JUNIOR, V.R.; CORREIA, J.L.A.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Cytotoxic activity of lectins from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and *Dioclea reflexa* (DrfL I) seeds on C6 glioma cells In: Current Topics Biochemistry UFSC, Florian3polis. *Current Topics Biochemistry UFSC*. 2018.
19. NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN, I.A.V.; **HEINRICH, I.A.**; WELTER, P.G.; MANN, JOSIANE; Osterne, V.; Martins, M.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Evaluation of antitumor potential of lectins from *Dioclea violacea* (DVL) and *Canavalia ensiformis* (ConA) in U-87 glioma cells In: Current Topics Biochemistry UFSC, Florian3polis. *Current Topics Biochemistry UFSC*. 2018.
20. MANN, J.; WOLIN, I.A.V.; NASCIMENTO, A.P.M.; **HEINRICH, I.A.**; WELTER, P.G.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Evaluation of antitumor potencial of lectin from *Canavalia grandiflora* (ConGf) in C6 glioma cells In: Current Topics Biochemistry UFSC, 2018, Florian3polis. *Current Topics Biochemistry UFSC*. 2018.
21. WOLIN, I.A.V.; **HEINRICH, I.A.**; NASCIMENTO, A.P.M.; WELTER, P.G.; MANN, J.; REIS JUNIOR, V.P.; CORREIA, J.L.A.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Cytotoxic Activity of Lectins from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) and *Dioclea reflexa* (DrfL I) Seeds on C6 Glioma Cells. In: Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology SBBq, Joinville - SC. *47a. Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq*, 2018.
22. NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN, I.A.V.; **HEINRICH, I.A.**; WELTER, P.G.; MANN, J.; OSTERNE, V.J.S.; MARTINS, M.G.Q.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Evaluation of Antitumor Potential of lectins from *Dioclea violacea* (DVL) and *Canavalia ensiformis* (ConA) in U-87 Glioma Cells. In: Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Joinville -SC. *47a. Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology - SBBq*, 2018.
23. WOLIN, I.A.V.; NASCIMENTO, A.P.M.; **HEINRICH, I.A.**; WELTER, P.G.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Dioclea violacea* (DvL) and *Dioclea reflexa* (DrfL I)

- Lectins Display Antiglioma Activity In: 11th FENS Forum of Neuroscience, 2018, Berlin. *11th FENS Forum of Neuroscience*. **2018**.
24. NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN, I.A.V.; WELTER, P.G.; **HEINRICH, I.A.** NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Evaluation of autophagic cell death in U-87 Glioma Cells by the Dioclea violacea lectin (DVL). In: LAMEB 10 ANOS e VI SIP, Florianópolis - SC. *LAMEB 10 ANOS e VI SIP*, **2018**.
  25. WOLIN, I.A.V.; NASCIMENTO, A.P.M.; WELTER, P.G.; **HEINRICH, I.A.**; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Cytotoxic activity of lectin from Dioclea reflexa (Drfl I) seeds on glioma cells. In: LAMEB 10 ANOS E VI SIP, Florianópolis -SC. *LAMEB 10 ANOS E VI SIP*, **2018**.
  26. OSTERNE, V.J.S.; NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN, I.A.V.; WELTER, P.G.; **HEINRICH, I.A.**; ZANOTTO-FILHO, A.; LOSSIO, C. F.; SILVA, M. T. L.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LEAL, R. B. Efeito antitumoral da lectina de Dioclea violacea para células de glioma humano da linhagem U87. In: RENORBIO 2019 II Encontro de Biotecnologia do Nordeste, Fortaleza - CE. *II Encontro de Biotecnologia do Nordeste*, **2019**.
  27. NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN, I.A.V.; **HEINRICH, I.A.**; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Lectin from Dioclea Violacea exhibits a selective cytotoxic effect on glioma cell line. In: Simpósio Integrado do Programa de Pós-graduação em Neurociências UFSC, Florianópolis - SC. *Simpósio Integrado do Programa de Pós-graduação em Neurociências UFSC*, **2019**.

#### **Apresentação de trabalhos**

28. **HEINRICH, I.A.**; FREITAS, A.E.; WOLIN, I.A.V.; NASCIMENTO, A. P. M.; MANN, J.; LEAL, R.B. Aumento da Expressão de NARP após Tratamento Crônico com Fluoxetina. **2018**.
29. **HEINRICH, I.A.**; OLIVEIRA, J.; VENSKE, D.K.R.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Evaluation of the Neuroprotective Effect of ConBr Lectin in a model of organotypic hippocampal cultures exposed to oxygen and glucose deprivation. **2018**.
30. **HEINRICH, I.A.**; WOLIN, I.A.V.; NASCIMENTO, A.P.M.; LOSSIO, C.F.; OLIVEIRA, M.V.; SILVA, M.T.L.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. ConBr Lectin Modulates MAPK Pathway and Displays Antiglioma Potential. **2018**.
31. **HEINRICH, I.A.** Oficina Biologando e exposição de macromodelos anatômicos. **2019**.

#### **Organização de eventos**

32. Semana Nacional do Cérebro UFSC, **2019**. (Organização e apresentação de palestra)
33. Congresso Current Topics in Biochemistry, **2019**. (Organização e avaliação de pôsteres)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1	REDE NEURAL E CIRCUITOS NEURONAIS .....	23
1.2	RECEPTORES AMPA.....	25
<b>1.2.1</b>	<b>Subunidade GluA4</b> .....	<b>28</b>
1.3	PROTEÍNAS PENTRAXINAS .....	29
<b>1.3.1</b>	<b>Pentraxina regulada pela atividade neuronal (Narp)</b> .....	<b>32</b>
1.4	JUSTIFICATIVA .....	34
1.5	OBJETIVO GERAL .....	36
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I: GLUA4 E NARP NA FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO</b> <b>37</b>	
2.1	TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	37
2.2	TERAPIA ANTIDEPRESSIVA.....	38
2.3	EXCITAÇÃO-INIBIÇÃO NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO .....	39
2.4	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	40
2.5	MÉTODOS .....	40
<b>2.5.1</b>	<b>Animais</b> .....	<b>40</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Drogas e tratamentos</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Testes comportamentais</b> .....	<b>43</b>
2.5.3.1	<i>Teste do nado forçado (TNF)</i> .....	43
2.5.3.2	<i>Teste do campo aberto (TCA)</i> .....	44
<b>2.5.4</b>	<b>Análises neuroquímicas</b> .....	<b>44</b>
2.5.4.1	<i>Preparação das amostras</i> .....	44
2.5.4.2	<i>Dosagem de proteínas</i> .....	45
2.5.4.3	<i>Eletroforese</i> .....	45
2.5.4.4	<i>Eletrotransferência</i> .....	45

2.5.4.5	<i>Imunodeteção</i> .....	45
2.5.5	<b>Análise estatística</b> .....	47
2.6	<b>RESULTADOS</b> .....	47
2.6.1	<b>Padronização do anticorpo da Narp e dos testes comportamentais</b> .....	47
2.6.2	<b>O tratamento agudo com cetamina e com ConBr provoca um efeito tipo antidepressivo no TNF</b> .....	49
2.6.3	<b>Investigação das modulações da Narp e GluA4 diante de tratamentos agudos com cetamina e com ConBr</b> .....	50
2.6.4	<b>O tratamento crônico com fluoxetina provoca um efeito tipo antidepressivo no TNF</b>	56
2.6.5	<b>O tratamento crônico com fluoxetina diminui a expressão de GluA4 e regula proteínas-chave para a sinaptogênese e plasticidade sináptica</b> .....	57
2.7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	64
2.8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	70
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II: GLUA4 E NARP NA FISIOPATOLOGIA DA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL COM ESCLEROSE HIPOCAMPAL (ELTM-EH)</b>	<b>71</b>
3.1	<b>EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)</b> .....	71
3.2	<b>ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS</b> .....	72
3.3	<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b> .....	72
3.4	<b>MÉTODOS</b> .....	73
3.4.1	<b>Pacientes</b> .....	73
3.4.2	<b>Protocolo de anestesia</b> .....	73
3.4.3	<b>Tratamento com dexametasona (DEXA)</b> .....	74
3.4.4	<b>Cirurgia, variáveis transoperatórias e clínicas e amostragem do tecido cerebral</b>	74
3.4.5	<b>Análises neuroquímicas</b> .....	75
3.4.5.1	<i>Preparação das amostras</i> .....	75
3.4.5.2	<i>Dosagem de proteínas</i> .....	76

3.4.5.3	<i>Eletroforese</i> .....	76
3.4.5.4	<i>Eletrotransferência</i> .....	76
3.4.5.5	<i>Imunodeteção</i> .....	77
3.4.6	<b>Análise estatística</b> .....	<b>78</b>
3.5	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>78</b>
3.5.1	<b>Modulações de GluA4, Narp e outras proteínas no córtex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELTM-EH</b> .....	<b>78</b>
3.5.2	<b>O efeito da administração de dexametasona na modulação de GluA4 e Narp</b> <b>84</b>	
3.6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>90</b>
3.7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>93</b>
4	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>95</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>96</b>
	<b>ANEXO A – Artigo publicado da tese</b> .....	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A transmissão sináptica depende de vários eventos coordenados espacial e temporalmente que permitem a comunicação neuronal. Esses eventos são coordenados por uma diversidade de proteínas específicas, cujas interações dinâmicas, expressão e regulação definem a eficácia da transmissão e o modo de plasticidade sináptica.

### 1.1 REDE NEURAL E CIRCUITOS NEURONAIS

Em uma visão reducionista do funcionamento do sistema nervoso central (SNC) podemos dividir a rede neural em dois tipos de neurônios: neurônios principais glutamatérgicos (que liberam o neurotransmissor excitatório glutamato) e interneurônios GABAérgicos (que liberam o neurotransmissor inibitório ácido  $\gamma$ -aminobutírico – GABA). Em nível cortical e de hipocampo os neurônios glutamatérgicos predominam, formando cerca de 80% da rede neural enquanto os neurônios GABAérgicos constituem um remanescente de 10 a 20% (HU; GAN; JONAS, 2014). Apesar disso, os neurônios GABAérgicos desempenham funções fundamentais por controlarem ou coordenarem a atividade dos circuitos neuronais excitatórios.

A excitação no cérebro deve ser equilibrada com a inibição e permite o ajuste fino de nossos humores, pensamentos e ações. Um desequilíbrio entre excitação e inibição pode estar envolvido no início da excitotoxicidade isquêmica (BLAESSE *et al.*, 2009), bem como transtornos psiquiátricos, como epilepsia, esquizofrenia, transtorno bipolar, transtorno depressivo maior e transtorno de ansiedade (ENGEL, 1996; LUSCHER; SHEN; SAHIR, 2011). Há evidências extensas de que o estresse e a depressão desequilibram a função do GABA, o principal sistema neurotransmissor inibitório no cérebro responsável pelo controle geral e pelo ajuste fino da transmissão excitatória (FEE; BANASR; SIBILLE, 2017; GHOSAL; HARE; DUMAN, 2017). Reduções na conectividade sináptica e déficits na sintonia inibitória podem prejudicar a funcionalidade dos circuitos neurais, reduzindo a precisão, a eficiência e a integridade das funções portadoras de informações dessas redes.

A região perissomática dos principais neurônios corticais, compreendendo o corpo celular, os dendritos proximais e o segmento inicial do axônio, é um local crítico para a geração do potencial de ação. As entradas inibitórias que chegam a essa região podem controlar o disparo destes neurônios e sincronizar a atividade de grandes conjuntos neuronais, levando a um controle eficiente do processamento neural (MILES *et al.*, 1996). Dois tipos principais de

células GABAérgicas são conhecidas por inervarem a região perissomática: as células axoaxônicas e células em cesto. As primeiras formam sinapses no segmento inicial do axônio e as segundas nos dendritos proximais e no soma (GULYÁS *et al.*, 1993; SOMOGYI *et al.*, 1983; VERES *et al.*, 2014).

As células em cesto são geralmente divididas em dois grupos pela expressão de marcadores neuroquímicos: a proteína de ligação ao cálcio parvalbumina (PV) e a colecistocinina (CCK). As células em cesto contendo parvalbumina são denominadas neurônios GABAérgicos de disparo rápido parvalbumina positivos (“*fast-spiking parvalbumin (+) GABAergic interneurons*”) ou interneurônios PV+ e desempenham um papel crucial no controle de circuitos neuronais (GULYÁS *et al.*, 2010; SOHAL *et al.*, 2009; STARK *et al.*, 2014).

Um conjunto de estudos têm demonstrado que prejuízos na atividade dos interneurônios PV+, podem estar envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças neurológicas e psiquiátricas incluindo: epilepsia, esquizofrenia e transtorno depressivo maior (HU; GAN; JONAS, 2014; ROTARU; LEWIS; GONZALEZ-BURGOS, 2012; SAUER; STRÜBER; BARTOS, 2015). Além disso, devido as suas características funcionais, estes neurônios apresentam um metabolismo energético aeróbico muito intenso (KANN, 2016; KANN; PAPAGEORGIOU; DRAGUHN, 2014) de forma que essas células são extremamente vulneráveis a diversas formas de estresse.

A modulação dos interneurônios GABAérgicos de disparo rápido parvalbumina positivos é complexa. Entretanto, envolve de uma forma proeminente receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico (AMPA) que são expressos nestes interneurônios (ROTARU; LEWIS; GONZALEZ-BURGOS, 2012).

Os receptores glutamatérgicos podem ser modulados de múltiplas formas. Classicamente, pelo lado intracelular (C-terminal) a modulação pode ocorrer através da fosforilação de resíduos de serina (principalmente), treonina ou tirosina por uma diversidade de proteínas cinases (ex. proteína cinase A, PKA; proteína cinase C, PKC; e proteína cinase cálcio calmodulina-dependente II, CaMKII) (WANG *et al.*, 2014a). Além disso, pelo lado extracelular a modulação de AMPA pode ocorrer por interação dos glicanos, presentes nas subunidades do receptor, com lectinas (proteínas ligadoras de carboidratos) exógenas (EVERTS; VILLMANN; HOLLMANN, 1997) bem como lectinas endógenas como as da família das pentraxinas neuronais (PELKEY *et al.*, 2015).

## 1.2 RECEPTORES AMPA

Os receptores AMPA (AMPA<sub>R</sub>s) são um subtipo de receptor glutamatérgico ionotrópico, sendo que na grande maioria das sinapses excitatórias no cérebro dos mamíferos impulsionam a neurotransmissão. Esses receptores desempenham papéis essenciais não apenas na formação, função e manutenção de sinapses, mas também em diferentes formas de plasticidade sináptica (MALENKA; BEAR, 2004; SHEPHERD; HUGANIR, 2007; SPRENGEL, 2006).

Os receptores AMPA apresentam estrutura tetramérica que pode se configurar como homo ou heterotetrâmeros, sendo compostos pelas subunidades GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4. Todas as subunidades compartilham uma conformação similar na membrana plasmática (**Fig. 1**) que inclui: 3 domínios transmembrana (M1, M3 e M4); um domínio *hairpin* (M2); um domínio extracelular (N-terminal), com vários sítios de glicosilação; um domínio intracelular C-terminal, que apresenta diversos sítios de fosforilação (**Fig. 2**) (HENLEY; WILKINSON, 2016; SONG; HUGANIR, 2002). Estas diversas combinações homo e heteroméricas de quatro subunidades geram uma enorme heterogeneidade funcional, como por exemplo na cinética e permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , e podem variar nas diferentes regiões do cérebro (DINGLELINE *et al.*, 1999; HOLLMANN, 1994).

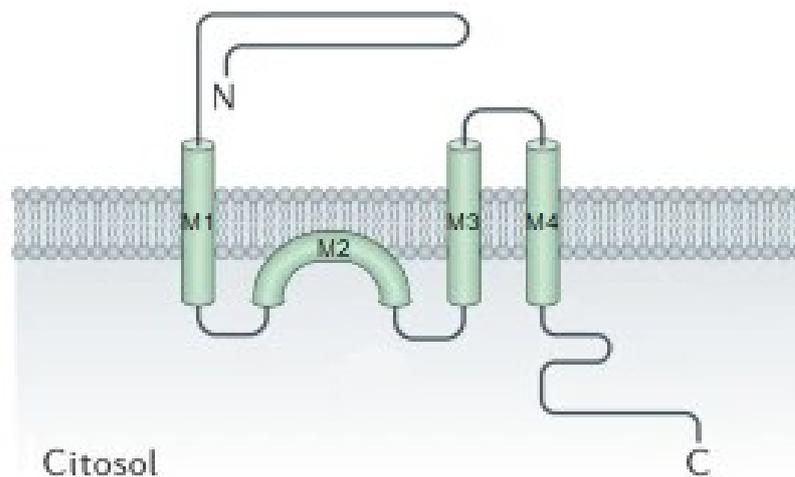


Fig. 1 Esquema de uma subunidade do receptor AMPA (AMPA<sub>R</sub>). Cada subunidade contém: um domínio amino-terminal (N-terminal) extracelular que contém um sítio de ligação ao glutamato; um domínio intracelular carboxi-terminal (C-terminal), onde estão presentes alguns sítios de fosforilação;

quatro domínios de membrana, três dos quais (1, 3 e 4) atravessam a membrana. O domínio 2 parece formar um *loop* reentrante na membrana, participando do revestimento do canal iônico. As subunidades se combinam para formar tetrâmeros, sendo a maioria dos AMPARs heterotetraméricos. Adaptado de Henley & Wilkinson (2016)

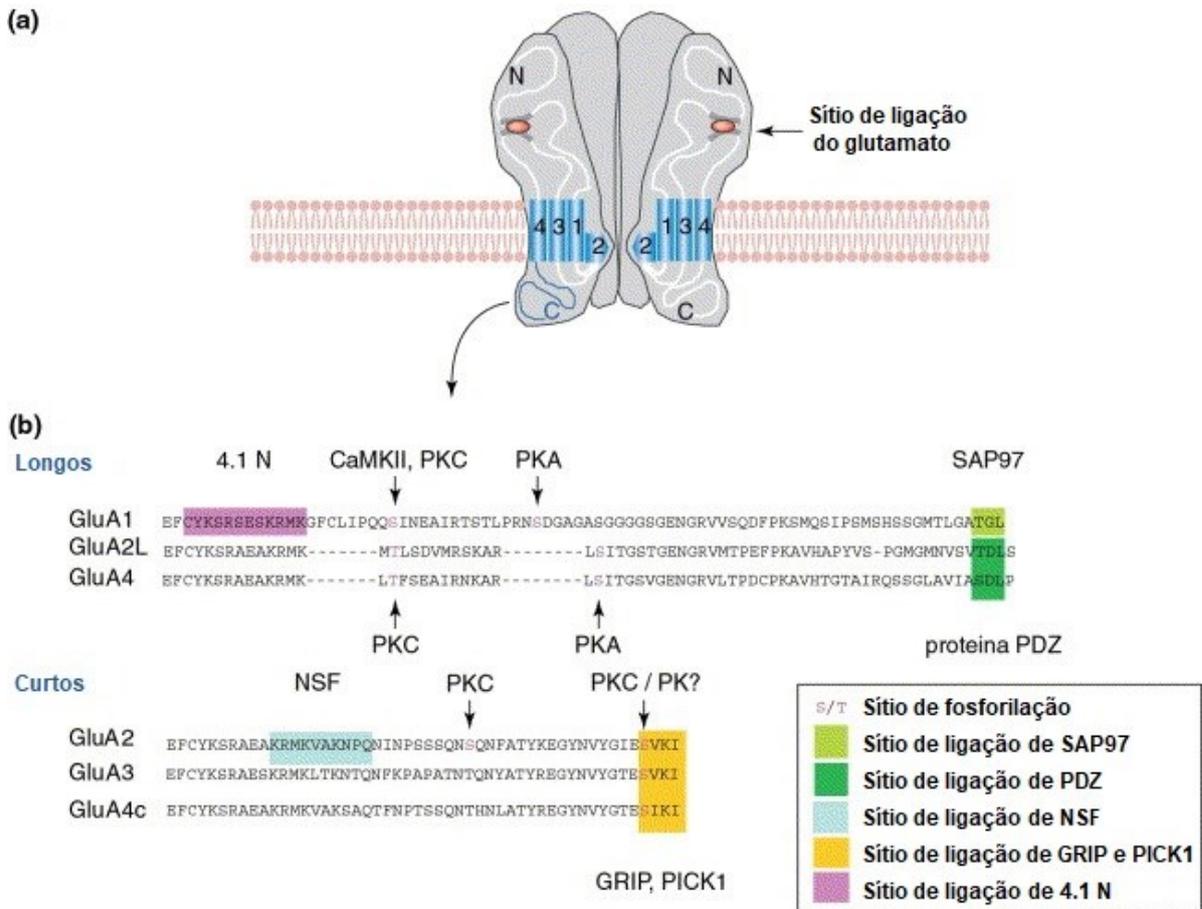


Fig. 2 Os domínios C-terminal permitem a regulação específica da subunidade dos AMPAR. (a) Os receptores AMPA são complexos heteroméricos de quatro subunidades (GluA1-GluA4) que se montam de forma variada para produzir subtipos de receptores específicos. O domínio C-terminal é o principal domínio intracelular de cada subunidade e está presente em uma forma longa ou curta. (b) GluA1, GluA4 e um variante de GluA2 (GluA2L) têm domínios C-terminais longos, enquanto GluA2, GluA3 e um variante de GluA4 (GluA4c) têm domínios C-terminais curtos. Esta região C-terminal do receptor AMPA contém os locais de fosforilação (indicados pelas setas), bem como locais para interação proteína-proteína (indicado pelo sombreado colorido), sendo, portanto, uma região crucial para a regulação específica das subunidades do AMPAR. Adaptado de Song & Huganir (2002)

Os subtipos de receptor GluA são expressos diferencialmente nos neurônios neocorticais e aumentam em quantidade após o nascimento (MONYER; SEEBURG; WISDEN,

1991). Muitas regiões do cérebro mostram baixa expressão de GluA2 e alta expressão de GluA4 no início do desenvolvimento, um padrão que é revertido conforme o desenvolvimento progride (PICKARD *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2000). As células piramidais expressam principalmente GluA2 e GluA3 e algum GluA1, enquanto os interneurônios inibitórios expressam principalmente GluA1/4 com quantidades menores de GluA2 e GluA3 (GEIGER *et al.*, 1995; JONAS *et al.*, 1994). A entrega sináptica de certas combinações de AMPA é conduzida principalmente por padrões de atividade específicos, em particular para certas sinapses ou tipos de células (CLEM; BARTH, 2006; JU *et al.*, 2004; KIELLAND *et al.*, 2009).

A modulação dos receptores AMPA e seu papel na neuroplasticidade tem sido amplamente estudado e revisado (CHATER; GODA, 2014; HENLEY; WILKINSON, 2016; HUGANIR; NICOLL, 2013; KESSELS; MALINOW, 2009; SANDERSON; DELL'ACQUA, 2011). Entretanto, deve ser salientado que grande parte dos estudos foca na modulação da subunidade GluA1 que juntamente com a subunidade GluA2 apresenta uma ampla distribuição no SNC adulto. O aumento de condutância, localização sináptica da subunidade GluA1 de AMPA e sua implicação na potenciação sináptica (LTP) tem sido considerada, na maior parte dos estudos, como dependente da fosforilação de dois sítios principais: Ser845, por PKA e Ser831 por PKC ou CaMKII (FERRETTI *et al.*, 2015; HENLEY; WILKINSON, 2016; LEE *et al.*, 2000; LUSSIER; SANZ-CLEMENTE; ROCHE, 2015; WANG *et al.*, 2014a; WOOLFREY; DELL'ACQUA, 2015). Por outro lado, a defosforilação destes sítios tem sido associada à depotenciação sináptica (LTD) (SANDERSON; GORSKI; DELL'ACQUA, 2016).

Entretanto, a fosforilação/defosforilação de outros sítios de GluA1 como Ser818 e mais recentemente Ser840 têm sido apontados como importantes, tanto para o posicionamento sináptico do receptor (associado à potenciação sináptica, LTP) como para sua internalização (associada à depotenciação sináptica, LTD) (BABIEC; GUGLIETTA; O'DELL, 2016; WANG *et al.*, 2014b). Em relação à subunidade GluA2 tem sido documentada a fosforilação do sítio Ser880 por PKC, implicando em provável internalização da subunidade (WANG *et al.*, 2014a).

As subunidades GluA1 e GluA4 consistem em uma extremidade C-terminal longa, enquanto as subunidades GluA2 e GluA3 consistem em uma extremidade C-terminal curta. Extremidades longas impedem que AMPARs contendo GluA1/4 sejam inseridos diretamente na sinapse na ausência de atividade, enquanto as extremidades curtas de AMPARs contendo GluA2/3 permitem a inserção sináptica direta (BORGDORFF; CHOQUET, 2002).

### 1.2.1 Subunidade GluA4

Os estudos apontam que a subunidade GluA4 é expressa significativamente em estágios iniciais do desenvolvimento do encéfalo (HENLEY; WILKINSON, 2016; LUCHKINA *et al.*, 2014). Entretanto, esta subunidade tem uma expressão mais restrita no tecido nervoso adulto, onde níveis mais proeminentes são observados nas células granulares do cerebelo e no tálamo. Contudo, deve ser salientado que na fase adulta a subunidade GluA4 é expressa nos interneurônios GABAérgicos de disparo rápido parvalbumina positivos, no hipocampo e córtex cerebral, sendo um elemento chave nas propriedades eletrofisiológicas destas células (BERNARD; SOMOGYI; BOLAM, 1997; PELKEY *et al.*, 2015).

Da mesma forma que em outras subunidades a modulação extracelular e intracelular pode ocorrer na subunidade GluA4. O mapeamento de fosfopeptídeos identifica o resíduo Ser842 como o principal local de fosforilação na região intracelular C-terminal das subunidades GluA4, que pode ser fosforilada por CaMKII, PKC e PKA (**Fig. 3**). Além disso, PKC pode fosforilar o resíduo Thr830. A fosforilação de Ser842 por PKA tem sido apontada como fator importante para inserção sináptica e atividade do receptor, sendo implicada na neuroplasticidade (CARVALHO; KAMEYAMA; HUGANIR, 1999; WANG *et al.*, 2014a). Ao contrário de GluA1, onde a atividade de PKA e CaMKII são coordenadas para recrutamento sináptico, a fosforilação de GluA4 por PKA sozinha é suficiente para entrega e retenção nas sinapses (ESTEBAN *et al.*, 2003).

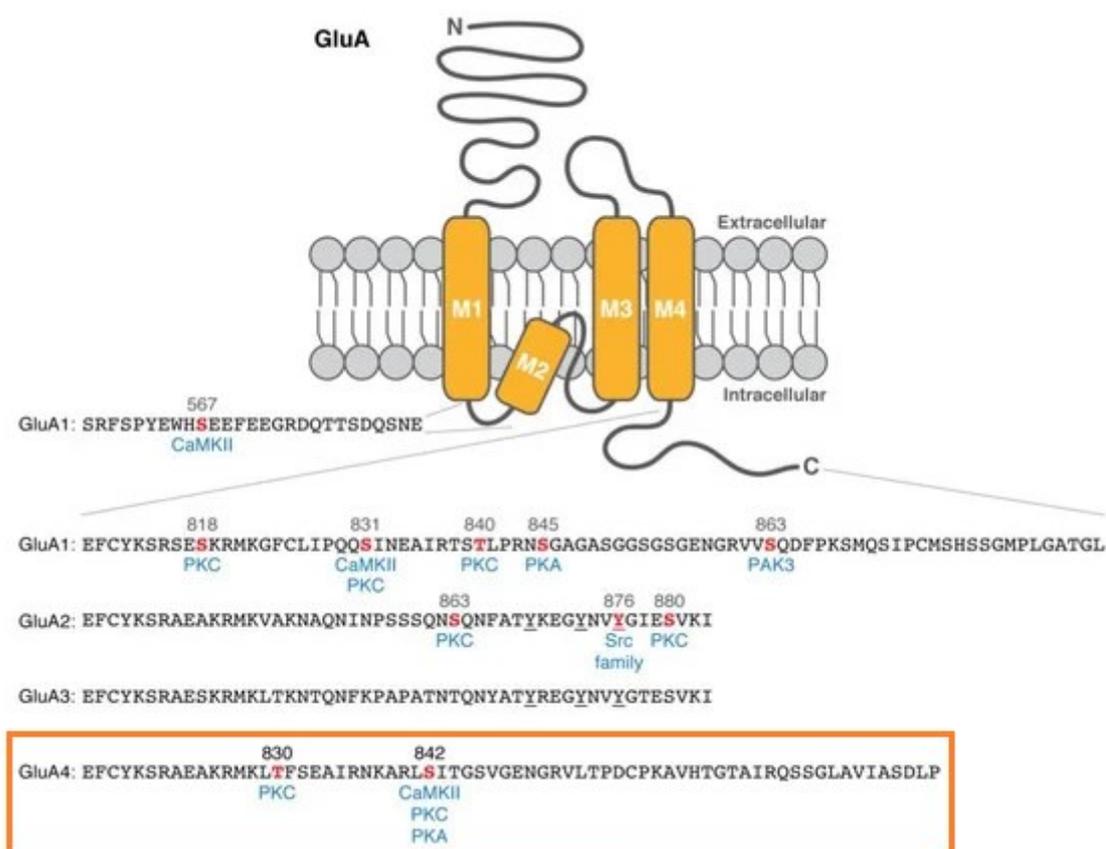


Fig. 3 Locais de fosforilação das subunidades do AMPAR. Os locais de fosforilação identificados são mostrados em vermelho e as proteínas cinases são listadas em azul abaixo dos locais de fosforilação. A ênfase na subunidade GluA4 chama a atenção para seus sítios de fosforilação Treonina 830 e Serina 842. Adaptado de Henley & Wilkinson (2016)

### 1.3 PROTEÍNAS PENTRAXINAS

As pentraxinas (PTXs) representam uma família de proteínas com homologia na sequência, apresentando estrutura pentamérica e capacidade de ligação a carboidratos de maneira  $\text{Ca}^{2+}$ - dependente, sendo, portanto, lectinas-*like*. Esta família inclui: pentraxinas curtas, como proteína C reativa (CRP) e componente amiloide P do soro (SAP) (DU CLOS, 2013); pentraxinas longas, como PTX3 (relacionada à defesa e inflamação) e as pentraxinas neuronais (NPTX1, NPTX2 e NRP) (OSERA *et al.*, 2012). NRP (abreviação de *neuronal pentraxin receptor*), NP1 (ou NPTX1) e NP2 (conhecida como NPTX2 ou Narp, abreviação de *neuronal activity-regulated pentraxin*) são lectinas expressas por neurônios (OSERA *et al.*, 2012; TSUI *et al.*, 1996).

Tanto Narp quanto NP1 são proteínas secretadas, enquanto NPR é ligado à membrana através do glicosilfosfatidilinositol (GPI). As pentraxinas são expressas preferencialmente nas sinapses excitatórias de interneurônios positivos para parvalbumina (CHANG *et al.*, 2010). A estrutura dessas proteínas permite uma ligação seletiva com os domínios extracelulares das subunidades GluA, permitindo-lhes modular o agrupamento AMPAR (O'BRIEN *et al.*, 1999).

Conforme ilustrado na **Fig. 4**, NP1 e Narp podem se associar por meio de interações proteína-proteína em heterocomplexos na membrana pré ou pós-sináptica (XU *et al.*, 2003), ancoradas pela ligação ao NPR, e promovem a agregação de AMPARs por meio de uma interação direta com o N-terminal das subunidades GluA (GEK-MING *et al.*, 2007). Tanto NP1 quanto Narp são capazes de se ligar ao domínio extracelular N-terminal de GluA1 e GluA4, embora em diferentes graus de afinidade e, ao fazer isso, promovem o agrupamento de AMPARs.

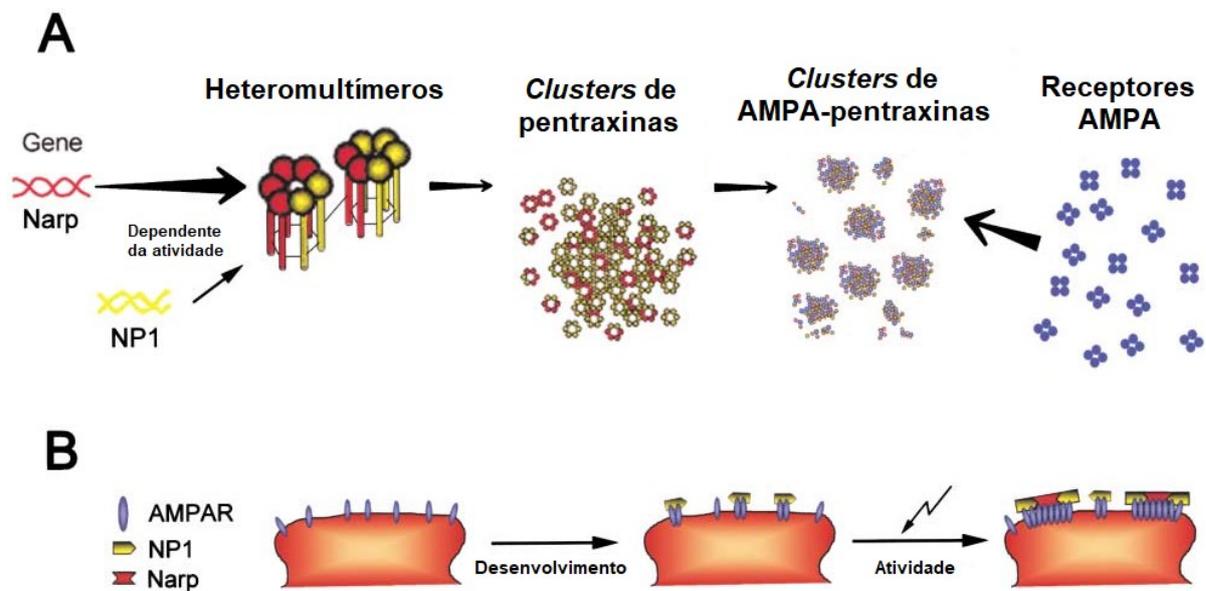


Fig. 4 Pentraxinas neuronais. (a) Narp e NP1 promovem a agregação de AMPARs. A expressão de Narp induzida por atividade resulta na formação de *clusters* NP1/Narp. Esses *clusters* têm a capacidade de se agrupar e induzir agrupamento dos AMPARs. (b) Uma hipótese para a função das pentraxinas na sinapse. Narp e NP1 agregam AMPAR em locais sinápticos. A regulação diferencial das duas pentraxinas fornece um mecanismo pelo qual a célula pode ajustar a composição de pentraxinas e o grau de agrupamento do receptor durante o desenvolvimento e em resposta à atividade sináptica. Adaptado de Xu *et al.* (2003)

Essa capacidade que as pentraxinas têm de agrupar os AMPAR, além de contribuir para o recrutamento desses receptores para a sinapse também contribui para o processo de endocitose dos mesmos (**Fig. 5**). Isso ocorre através da clivagem da ligação de GPI do NPR, desencaixando os complexos de pentraxina da face da membrana pré-sináptica seguido pela endocitose dos complexos GluA-pentraxina (CHO *et al.*, 2009).

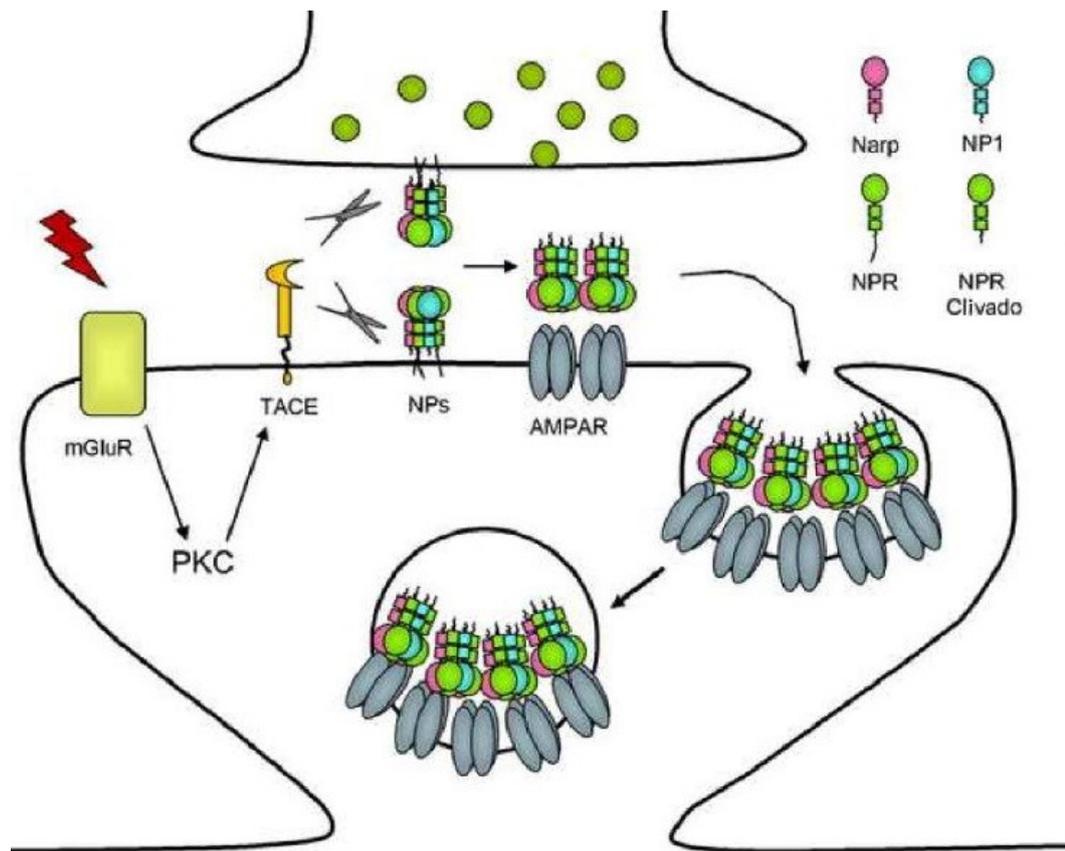


Fig. 5 Pentraxinas exercem controle bifuncional nas sinapses. As pentraxinas atuam como agentes sinaptogênicos, recrutando AMPAR para sinapses, mas além disso, após a ativação da enzima conversora de  $\text{TNF-}\alpha$  (TACE) e outros eventos de sinalização, TACE cliva NPR e permite que NPR e as pentraxinas neuronais associadas NP1 e Narp agrupem AMPAR no local da atividade de TACE. Com isso, ocorre aumento da taxa de endocitose de AMPAR e esse processo é essencial para a LTD. Adaptado de Cho *et al.* (2009)

Na literatura há um trabalho que demonstra que camundongos sem NP1 e NARP apresentam um atraso na maturação funcional das sinapses glutamatérgicas no sistema visual (BJARTMAR *et al.*, 2006). A pentraxina neuronal 1 (NPTX1) e o receptor neuronal de pentraxina (NPR) são proteínas intimamente relacionadas à Narp (DODDS *et al.*, 1997). Em

conjunto essas proteínas podem funcionar regulando a sinaptogênese glutamatérgica através do agrupamento de receptores AMPA, por exemplo (O'BRIEN *et al.*, 1999). Entre as pentraxinas neuronais, Narp (NPTX2 ou NP2) tem se destacado no envolvimento em mecanismos de neuroplasticidade (CHANG *et al.*, 2010; GU *et al.*, 2013; MARIGA *et al.*, 2015).

### 1.3.1 Pentraxina regulada pela atividade neuronal (Narp)

As mudanças de longo prazo na eficácia sináptica requerem rápida síntese de mRNA e subsequente tradução em produtos proteicos mediados por uma classe de proteínas conhecidas como genes de expressão imediata (do inglês *immediate early gene*, IEG). A plasticidade dependente da atividade é iniciada quando a excitação sináptica ativa cascatas de sinalização bioquímica começando na sinapse e terminando no núcleo onde novos padrões de expressão gênica são induzidos. Os produtos proteicos resultantes desses genes regulados por atividade, atuam por meio de diversos mecanismos de sinalização para modificar várias propriedades funcionais do neurônio, aumentando ou enfraquecendo a força sináptica. Há um grande número de IEGs identificados que regulam a plasticidade sináptica e podem ser agrupados em duas classes, os fatores que regulam a transcrição de outros genes, como zif268, Egr-3, c-jun e c-fos e IEGs efetores, como Homer, Arc, Rheb, Cox-2 e Narp (LANAHAN; WORLEY, 1998) que atuam diretamente sobre a função celular por meio de interações proteína-proteína para promover vários aspectos da plasticidade.

Um mecanismo conhecido de modulação da força sináptica envolve o agrupamento de AMPARs (O'BRIEN; LAU; HUGANIR, 1998). Embora haja uma variedade de modelos para o agrupamento e posicionamento de AMPARs em uma sinapse, em interneurônios tem sido descrito um mecanismo dependente da atividade neuronal e que envolve a secreção para o meio extracelular do produto de um IEG conhecido como Narp (O'BRIEN *et al.*, 2002, 1999).

Narp foi descrita em 1996 como uma lectina dependente de  $Ca^{2+}$ , sendo regulada através de um IEG em resposta a atividade neuronal, e capaz de ser secretada no espaço extracelular no hipocampo de forma a promover crescimento de neuritos (TSUI *et al.*, 1996). Dessa forma, após a atividade neuronal, a expressão de Narp parece aumentar em neurônios excitatórios. Posteriormente, Narp pode ser liberada para o espaço extracelular do terminal sináptico, se acumulando principalmente em sinapses excitatórias sobre interneurônios PV+ (CHANG *et al.*, 2010). Neste contexto, Narp interage com o domínio N-terminal extracelular da subunidade GluA4 de receptores AMPA gerando *clusters* destes receptores (GEK-MING *et*

*al.*, 2007; PELKEY *et al.*, 2015). Narp exibe, portanto, seletividade pela subunidade GluA4 do AMPAR (GEK-MING *et al.*, 2007) e, inclusive, foi mostrado que ela regula o agrupamento GluA4 em interneurônios de uma maneira dependente da atividade (CHANG *et al.*, 2010). Além da capacidade de Narp agregar AMPARs em sinapses estabelecidas, essa proteína também facilita a formação de novas sinapses, um processo denominado sinaptogênese (O'BRIEN *et al.*, 1999).

Tem sido destacado a expressão robusta de Narp no hipocampo, habênula e medula espinhal e seu papel na regulação de receptores AMPA (especialmente GluA4) através de interação com o sítio extracelular (N-terminal) do receptor. Notavelmente, essa interação propicia o enriquecimento sináptico e a formação de *clusters* de receptores AMPA contendo a subunidade GluA4 (CHANG *et al.*, 2010; O'BRIEN *et al.*, 2002, 1999; PELKEY *et al.*, 2015). Este processo parece ser fundamental para a modulação de interneurônios GABAérgicos de disparo rápido parvalbumina positivos, refletindo na modulação de sinapses excitatórias e consequentemente na modulação da neuroplasticidade neural (CHANG *et al.*, 2010; ELBAZ *et al.*, 2017; O'BRIEN *et al.*, 2002, 1999; PELKEY *et al.*, 2015). Outro ponto relevante é que camundongos nocaute para Narp (Narp<sup>-/-</sup>) apresentam prejuízo da neuroplasticidade demonstrando inabilidade de expressar dominância ocular (GU *et al.*, 2013) e sendo predispostos ao aparecimento de crises epilépticas (CHANG *et al.*, 2010).

Em modelo de peixe zebra (*zebrafish*) foi demonstrado que a deleção de Narp leva a prejuízo motor em resposta a estímulos externos, reforçando o papel fundamental de Narp na neuroplasticidade sináptica em circuitos neuronais excitatórios (ELBAZ *et al.*, 2017). Outro aspecto importante, dentro desse paradigma de modulação da plasticidade sináptica por Narp, foi à demonstração de que ratos submetidos a tratamento prolongado (21 dias) com alguns antidepressivos (ex. citalopram, maprotilina, amitriptilina e moclobenida) mostraram um aumento nos níveis de RNAm de Narp em todas as subregiões do hipocampo e na habênula medial (BJARTMAR *et al.*, 2010). Entretanto, este estudo avaliou apenas os níveis de RNAm, sem determinar os níveis e localização regional e celular da proteína Narp.

Um importante estudo também demonstrou que Narp tem sua expressão aumentada no hipocampo por um mecanismo dependente da sinalização do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (MARIGA *et al.*, 2015). Notavelmente, Narp e BDNF se apresentam enriquecidos na região do giro denteado, e de uma forma bastante consistente foi demonstrado que BDNF, via ativação do receptor TrkB acoplado à ativação de MEK/ERK1/2 e seguido da fosforilação de CREB (Ser-133), proporciona expressão significativa de Narp (**Fig. 6**) em

camundongos adultos. Esta ação de BDNF ocorre mesmo com bloqueio da atividade neuronal, indicando que a sinalização BDNF/TrkB/MEK-ERK/CREB é suficiente para ocasionar o efeito estimulador. O bloqueio da sinalização de BDNF causa diminuição dos níveis de Narp, demonstrando uma regulação bidirecional. Por fim, foi mostrado prejuízo da LTP nas fibras musgosas em camundongos Narp<sup>-/-</sup> (MARIGA *et al.*, 2015). Em conjunto o estudo indica que tanto modulação pré-sináptica (envolvendo liberação de glutamato) quanto mecanismos pós-sinápticos envolvendo modulação de AMPA podem estar envolvidos na modulação da neuroplasticidade hipocampal por Narp.

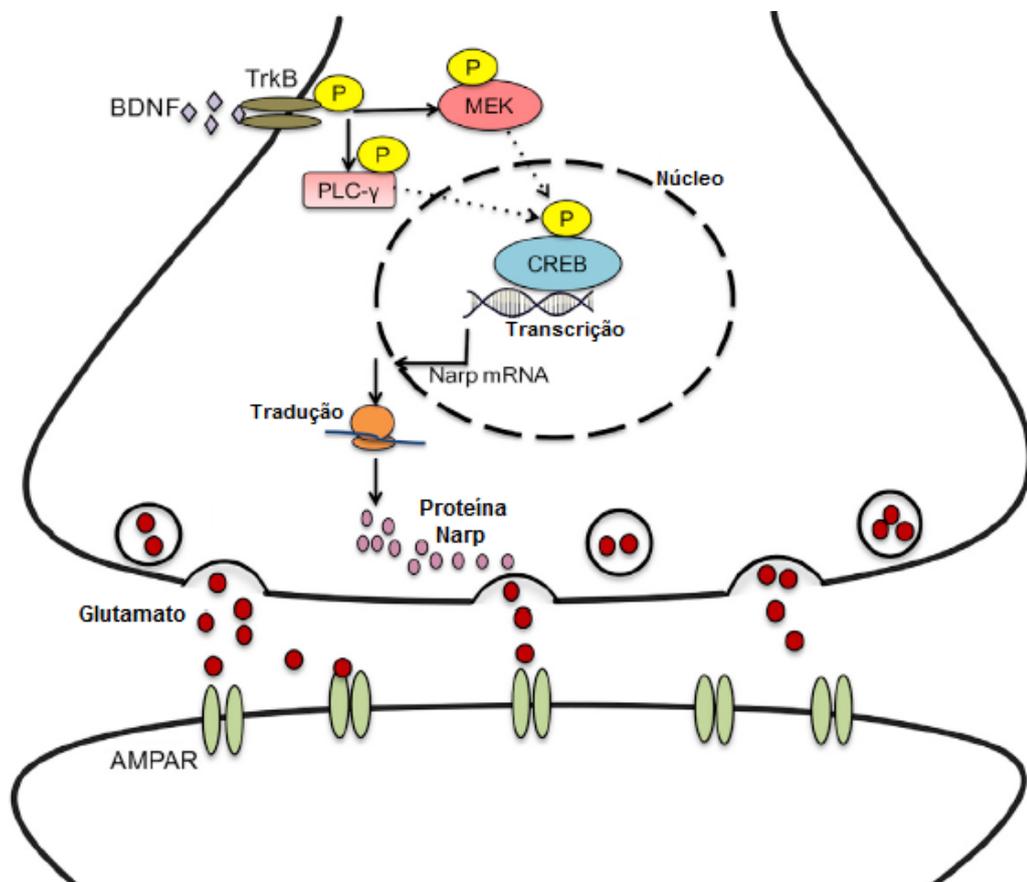


Fig. 6 O BDNF regula Narp para mediar a transmissão glutamatérgica. A sinalização de BDNF ativa principalmente a via MAPK, levando a fosforilação de CREB e subsequente aumento de Narp, que orchestra o processo de plasticidade na sinapse. Adaptado de Mariga *et al.* (2015)

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

Uma característica crítica do sistema nervoso é sua capacidade de modular a transmissão sináptica em resposta a padrões espaciais e temporais específicos de disparo

neuronal. O conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na plasticidade sináptica tem sido significativamente ampliado nas duas últimas décadas. Apesar disso, muitos aspectos ainda necessitam avanços. Da mesma forma, a determinação do envolvimento ou possível papel destes processos sinápticos e elementos moleculares em doenças neurológicas e psiquiátricas ainda carecem de estudo.

Nesse sentido pode ser destacado o transtorno depressivo maior, que é um transtorno psiquiátrico comum, crônico e que apresenta importante morbidade e, portanto, necessita ampliação da caracterização dos eventos moleculares associados e da indicação de possíveis alvos, adicionais aos que já estão relativamente bem caracterizados. Dessa forma, pesquisas que apontem novos caminhos e modalidades de tratamento para esta condição urge, face a prevalência e gravidade deste transtorno.

A hipótese monoaminérgica surgiu na década de 1960 e foi uma das primeiras teorias a demonstrar que drogas que agiam em sinapses dopaminérgicas, serotoninérgicas e noradrenérgicas aumentando o nível sináptico de monoaminas melhoravam os sintomas da depressão. Apesar de ser clinicamente útil e empregadas até os dias de hoje, há uma grande dificuldade em explicar a demora no tempo de ação clínica destas drogas, uma vez que, a ação neurobiológica destas na sinapse é imediata (DELGADO, 2000). Desta forma, tem-se estudado as diversas vias de sinalização intracelular envolvidas na etiopatologia da depressão e conseqüentemente na otimização da eficácia clínica ao tratamento atual.

A modulação do sistema glutamatérgico, tem sido apontada como uma estratégia farmacológica para melhorar a eficácia da terapia antidepressiva. Nesse sentido, parece importante estudar o papel de Narp na neuroplasticidade e nos mecanismos antidepressivos envolvendo modulação de receptores glutamatérgicos e vias de transdução de sinal. Lembrando o exposto anterior, Narp tem uma expressão rápida (IEG) em resposta a ativação da via BDNF/TrkB/ERK/CREB (MARIGA *et al.*, 2015) e um papel modulatório sobre AMPA (CHANG *et al.*, 2010; PELKEY *et al.*, 2015).

Outro ponto relevante que evoca a importância clínica desta abordagem é a indicação que a redução da expressão de Narp (animais nocaute) provoca uma propensão ao aparecimento de crises epiléticas em camundongos, aparentemente pela perda de modulação de receptores AMPA (GluA4), especialmente associados aos interneurônios GABAérgicos, de forma a diminuir a atividade inibitória destes interneurônios sobre redes neuronais (CHANG *et al.*, 2010). Assim, emerge um ponto de grande relevância que seria a avaliação da expressão de Narp e de receptores AMPA em tecido cerebral humano. Apesar da imensa dificuldade dessa

abordagem, nosso grupo tem sido pioneiro na utilização de tecido encefálico retirado a partir de pacientes submetidos a neurocirurgia por apresentarem epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH) e refratária aos todos tratamentos clínicos disponíveis. Nesse sentido tem sido desenvolvido estudos em relação aos mecanismos moleculares de sinalização celular envolvidos na epilepsia, na resposta a glicocorticoides, bem como ansiedade e medo a partir de tecido obtido de pacientes e de forma translacional estendido e detalhado em modelos animais (CARVALHO *et al.*, 2021; LEAL *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2016a, 2012, 2013, 2015, 2016b, 2016c; RONSONI *et al.*, 2016).

Considerando todos os mecanismos e estudos relevantes elencados, nota-se um papel bastante consistente de GluA4, uma subunidade do receptor AMPA, e Narp, uma pentraxina expressa no SNC de mamíferos, na modulação da plasticidade sináptica e a potencial implicação destas proteínas na fisiopatologia de diversas neuropatologias, incluindo transtorno depressivo maior e epilepsia.

## 1.5 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo caracterizar a modulação da subunidade GluA4 do receptor AMPA e da pentraxina Narp no contexto da depressão e da epilepsia.

## 2 CAPÍTULO I: GLUA4 E NARP NA FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO

Neste capítulo, desvendamos a modulação da Narp e da subunidade GluA4 do receptor AMPA em resposta a tratamentos antidepressivos e discutimos como estas e outras proteínas podem estar implicadas no mecanismo neuroquímico subjacente ao efeito antidepressivo.

### 2.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno psiquiátrico debilitante e recorrente, considerado uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o TDM é uma doença de alta prevalência, afetando mais de 320 milhões de pessoas em nível global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Entre 1990 e 2017, o número total estimado de casos incidentes de TDM aumentou 49,29% e o aumento da incidência da doença ocorreu em todas as regiões geográficas (LIU *et al.*, 2020).

É bem conhecido que déficits estruturais, neuroquímicos e funcionais nas regiões cortical e hipocampal levam à disfunção da transmissão sináptica (DUMAN; SANACORA; KRYSTAL, 2019) que compromete a funcionalidade dos circuitos neuronais, contribuindo para os sintomas depressivos. Apesar da complexidade de todas essas alterações, a maioria dos estudos se concentra na investigação do sistema monoaminérgico, uma vez que drogas que aumentam a disponibilidade de monoaminas são amplamente utilizadas no tratamento do TDM (PEREZ-CABALLERO *et al.*, 2019). No entanto, apesar das fortes evidências que indicam a importância do sistema serotoninérgico (ANDREWS *et al.*, 2015), é importante ressaltar que o sistema glutamatérgico também desempenha um papel crucial na modulação do refinado equilíbrio excitação-inibição (E:I) (FOGAÇA; DUMAN, 2019; SOHAL; RUBENSTEIN, 2019), que é decisivo para uma transmissão sináptica eficaz. Com isso, tem sido postulado que o sistema glutamatérgico desempenha um papel fundamental na patogênese do TDM (ATHIRA *et al.*, 2020; DUMAN, 2014a). Portanto, a investigação da modulação glutamatérgica seguida de um tratamento crônico com um antidepressivo clássico, como a fluoxetina, é de grande interesse.

Um crescente corpo de evidências tem mostrado que o TDM está associado à disfunção sináptica. A interrupção de circuitos complexos relacionados ao humor tem sido implicada no TDM, mas entre as descobertas da estrutura e função do cérebro alterada no TDM, a descoberta mais consistente é o volume reduzido do córtex pré-frontal (CPF) e do hipocampo

(HIP) (DUMAN *et al.*, 2016). Do ponto de vista clínico, os estudos de imagens cerebrais forneceram evidências consistentes de que o TDM está associado ao tamanho reduzido das regiões cerebrais implicadas na regulação do humor (RONALD S. DUMAN; AGHAJANIAN, 2012). Isso inclui a diminuição do volume do hipocampo, uma estrutura límbica com altos níveis de receptores de glicocorticóides que fornecem *feedback* negativo para o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (CHAN *et al.*, 2016). A diminuição do volume e da função dessas regiões cerebrais está implicada na conectividade e função neuronal alterada (DUMAN, 2014b).

## 2.2 TERAPIA ANTIDEPRESSIVA

Está bem estabelecido que o distúrbio do sistema serotoninérgico é uma característica importante na fisiopatologia do TDM (OSSO *et al.*, 2016). Com base nisso, os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) têm sido a primeira escolha para o tratamento com antidepressivos farmacológicos (NATIONAL INSTITUTE FOR CLINICAL EXCELLENCE, 2004). Desde sua introdução clínica em 1988 (WONG; PERRY; BYMASTER, 2005), a fluoxetina se tornou o principal antidepressivo prescrito em todo o mundo, sendo reconhecida como um fármaco seguro (PEREZ-CABALLERO *et al.*, 2014).

A modulação do sistema glutamatérgico, tem sido apontada como uma estratégia farmacológica para melhorar a eficácia da terapia antidepressiva. Antagonistas de receptores NMDA, particularmente a cetamina, também têm sido apontados como promissores no tratamento de TDM tendo em vista que produzem efeito antidepressivo rápido, persistente, em doses consideradas muito baixas (AUTRY *et al.*, 2011; DUMAN, 2014b; DURIC; DUMAN, 2013; GARCIA *et al.*, 2008; KAVALALI; MONTEGGIA, 2012; SALVADORE; SINGH, 2013; ZANOS *et al.*, 2016). A cetamina também parece ser efetiva em pacientes não responsivos ao tratamento da fluoxetina e com ideação suicida (BERMAN *et al.*, 2000; KRYSTAL, 2007). Apesar de que o efeito terapêutico da cetamina esteja amplamente documentado, o uso crônico desta pode resultar em efeitos indesejáveis tais como efeitos dissociativos, neurotoxicidade e atrofia cortical (EDWARD ROBERTS *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2013). Nesse sentido, esforços consideráveis devem ser investidos na busca de uma melhor compreensão entre o quadro depressivo e o sistema glutamatérgico, visto que este é, também, um importante alvo para a geração de antidepressivos de ação rápida.

Nosso grupo também demonstrou a ação tipo antidepressiva e neuroprotetora de outro composto: a lectina leguminosa ConBr, purificada das sementes de *Canavalia brasiliensis*; especialmente no que tange a modulação de receptores glutamatérgicos NMDA e AMPA e de vias neurotróficas de sinalização intracelular (BARAUNA *et al.*, 2006; JACQUES *et al.*, 2013; RIEGER *et al.*, 2014a, 2014b; RUSSI *et al.*, 2012). Vimos que ConBr induz a expressão de BDNF no hipocampo. Os nossos dados experimentais indicam que ConBr administrada i.c.v. por mecanismo envolvendo a ativação de PKA, ERK e AKT estimula a fosforilação de CREB. A fosforilação de CREB (no sítio Ser-133) é ativadora desse fator, estimulando a expressão hipocampal de BDNF (cujo gene apresenta o elemento de resposta ao AMPc, CRE) (RIEGER *et al.*, 2014a).

### 2.3 EXCITAÇÃO-INIBIÇÃO NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E HIPOCAMPO

O córtex pré-frontal (CPF) e o hipocampo (HIP) são compostos por uma extensa população neuronal que compreende principalmente os neurônios excitatórios glutamatérgicos e os interneurônios GABAérgicos inibitórios. Nessas regiões, os neurônios glutamatérgicos constituem aproximadamente 80% da rede neuronal, enquanto os interneurônios GABAérgicos abrangem 10-20% da população neuronal total (HU; GAN; JONAS, 2014; PELKEY *et al.*, 2017). Embora sejam minoria, esses interneurônios GABAérgicos são essenciais porque orquestram o equilíbrio E:I em estruturas corticolímbicas localizadas tanto no CPF quanto no HIP (MCBAIN; FISAHN, 2001).

Dado o amplo espectro de atividade neuronal controlada pelos interneurônios GABAérgicos, está cada vez mais claro que o desequilíbrio no sistema GABAérgico e, portanto, no equilíbrio E:I, pode contribuir para a fisiopatologia de vários transtornos psiquiátricos, incluindo o TDM (MÉNDEZ *et al.*, 2012). Considerando que os interneurônios GABAérgicos são abundantes no CPF e exercem um importante controle inibitório sobre a atividade do eixo HPA (AKANA *et al.*, 2001; RADLEY; GOSELINK; SAWCHENKO, 2009), é compreensível que o sistema GABAérgico desempenhe um papel essencial no processamento emocional.

Cabe ressaltar que um dos principais interneurônios GABAérgicos expressa a proteína albumina ligante de cálcio, representando cerca de 40% da população desses neurônios (RUDY *et al.*, 2011). Tais interneurônios são denominados interneurônios GABAérgicos de disparo rápido que expressam parvalbumina ou interneurônios PV+ (HU; GAN; JONAS, 2014).

Interações diretas entre os sistemas GABAérgico e serotoninérgico no núcleo da rafe e regiões corticais já foram relatadas (CELADA *et al.*, 2001; LLADÓ-PELFORT *et al.*, 2012; PUIG; ARTIGAS; CELADA, 2005; SANTANA *et al.*, 2004). No CPF, tanto os neurônios glutamatérgicos piramidais quanto os interneurônios GABAérgicos, com destaque para os PV+, expressam receptores serotoninérgicos (CELADA; VICTORIA PUIG; ARTIGAS, 2013; SANTANA *et al.*, 2004).

As propriedades de despolarização rápida e de alta amplitude dos interneurônios PV+ (HU; GAN; JONAS, 2014) são explicadas principalmente pela presença abundante da subunidade GluA4 do receptor AMPA (AMPA) que permeia o  $Ca^{2+}$  (PELKEY *et al.*, 2015). Esta subunidade pode ser modulada por meio da interação com a Narp nos interneurônios PV+, e, assim, ambas as proteínas desempenham um papel crucial na modulação sináptica no HIP e no CPF. Apesar de participarem do mecanismo de neuroplasticidade, GluA4 e Narp têm sido pouco explorados como supostos alvos na fisiopatologia do TDM.

## 2.4 OBJETIVO ESPECÍFICO

O objetivo aqui foi caracterizar os mecanismos neuroquímicos relacionados à modulação de Narp e GluA4 subjacentes ao tratamento agudo com cetamina e ConBr bem como com o tratamento crônico com fluoxetina, avaliando esses alvos proteicos no CPF e HIP.

## 2.5 MÉTODOS

### 2.5.1 Animais

Camundongos adultos machos (2 meses de idade, 30-40 g) da linhagem Swiss, fornecidos pela colônia de reprodução da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Brasil) foram mantidos em temperatura ambiente constante ( $20 \pm 2$  °C), com livre acesso à água e alimentação, em ciclo claro-escuro de 12/12 h (luzes acesas às 07:00). Esses animais foram alojados em grupos de 10 em caixas de 41 × 34 × 16 cm. Previamente aos testes comportamentais, as caixas foram colocadas na sala experimental para aclimatação (24h). Todas as manipulações foram realizadas entre 9h00 e 17h00 e cada animal utilizado apenas uma vez. Os procedimentos neste estudo foram realizados de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório do *National Institutes of Health* (NIH). Os experimentos foram

realizados após aprovação do protocolo (nº 2380161216) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais local (CEUA/UFSC) conforme resoluções do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais e o número de animais utilizados nos experimentos.

### 2.5.2 Drogas e tratamentos

Para o piloto (teste das vias de administração), os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: (1) *sham* (sem manipulação); (2) água destilada (p.o.; 10 ml/kg); (3) salina (i.p.; 10 ml/kg); (4) HEPES (i.c.v.; 3µL/sítio) (**Fig. 7**). Os animais foram tratados e posteriormente avaliados nos testes comportamentais.

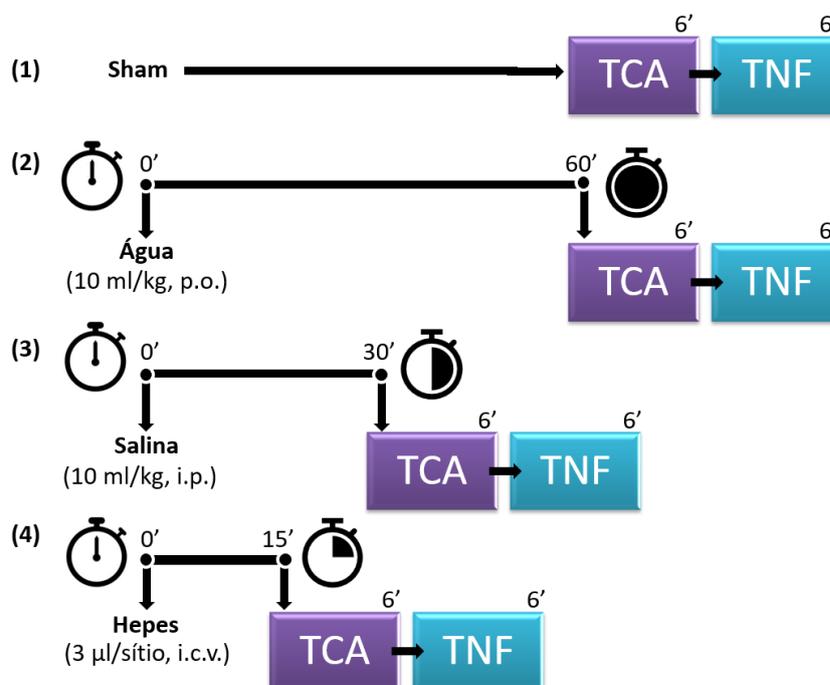


Fig. 7 Representação esquemática dos grupos experimentais para teste das vias de administração e veículos. Abreviaturas: TCA, Teste do campo aberto e TNF, Teste do nado forçado.

Para os tratamentos agudos, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: (1) veículo (controle); (2) veículo + cetamina 1 mg/kg; (3) veículo + ConBr 10 µg/sítio (**Fig. 8**). As doses e os momentos de administração foram escolhidos com base em estudos anteriores (FREITAS *et al.*, 2015; RIEGER *et al.*, 2014a). A cetamina foi obtida da Syntec (Barueri, SP, Brasil) e administrada por via intraperitoneal (i.p.) em um volume constante de 10 mL/kg de

peso corporal. O medicamento, preparado fresco antes de sua administração, foi diluído em salina. Já a ConBr, obtida do laboratório de biologia molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), foi diluída em tampão HEPES-salina sem glicose (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, HEPES 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,4) e administrada por via intracerebroventricular (i.c.v.; 3µL/sítio).

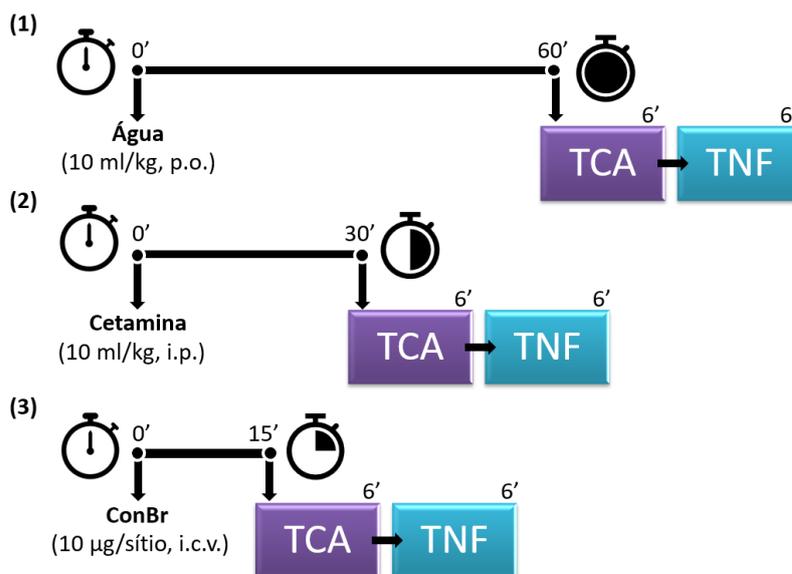


Fig. 8 Representação esquemática dos grupos experimentais do tratamento agudo. Abreviaturas: TCA, Teste do campo aberto e TNF, Teste do nado forçado.

Para o tratamento crônico, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: (1) veículo (controle); (2) fluoxetina 0,1 mg/kg; (3) fluoxetina 1 mg/kg; (4) fluoxetina 10 mg/kg (**Fig. 9**). As doses e os momentos de administração foram escolhidos com base em estudos anteriores (LOBATO *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2012). A fluoxetina foi obtida da EMS Sigma Pharma (São Paulo, SP, Brasil) e administrada por via oral (p.o.) por gavagem em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal. O medicamento, preparado fresco antes de sua administração, foi diluído em água potável. Os grupos foram igualmente tratados por gavagem com o veículo apropriado (água potável), por 21 dias e avaliados simultaneamente. Todos os tratamentos foram realizados por um pesquisador experiente.

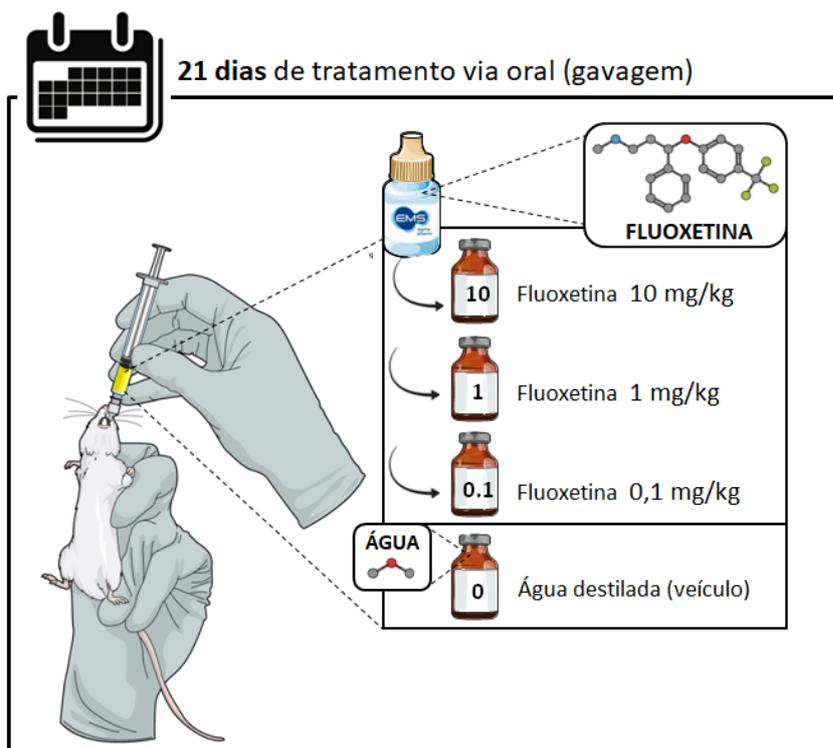


Fig. 9 Representação esquemática dos grupos experimentais do tratamento crônico com fluoxetina. Figura elaborada com algumas imagens do *Mind the Graph*®.

### 2.5.3 Testes comportamentais

Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado (TNF) e teste do campo aberto (TCA). O TNF e o TCA foram realizados com 10 minutos de intervalo no mesmo grupo de animais em uma sala com temperatura, ruído e luz controlados.

#### 2.5.3.1 Teste do nado forçado (TNF)

Os camundongos foram individualmente submetidos a um recipiente cilíndrico aberto (diâmetro de 10 cm; altura de 25 cm), contendo 19 cm de água (profundidade) a  $25 \pm 1$  °C. A água foi trocada entre um animal e outro. O tempo total que cada animal permaneceu imóvel durante uma sessão de 6 min foi registrado em segundos como tempo de imobilidade (FREITAS *et al.*, 2015; RIEGER *et al.*, 2014a) por um observador experiente cego em relação aos grupos experimentais. Um animal foi considerado imóvel ao fazer apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água. Uma diminuição da duração da imobilidade no TNF é indicativa de um efeito tipo antidepressivo (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977).

### 2.5.3.2 *Teste do campo aberto (TCA)*

Para excluir que os tratamentos causaram alteração da atividade locomotora, o que poderia indicar um efeito tipo antidepressivo falso positivo no TNF, camundongos foram avaliados individualmente no teste do campo aberto, conforme descrito anteriormente (DALMAGRO *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 1996). Os animais foram colocados em uma caixa de madeira medindo 40 × 60 × 50 cm com o piso da arena dividido em 12 quadrados iguais. Em uma sessão de 6 min, o número de cruzamentos (quadrados cruzados com todas as patas) foi contado. O assoalho (base) da arena foi limpo (a) com solução de 10% de etanol entre cada teste para ocultar pistas dos animais.

## 2.5.4 **Análises neuroquímicas**

Após os testes comportamentais, os camundongos foram imediatamente eutanasiados por decapitação e os córtices pré-frontais e hipocampus foram coletados para análise de *western blot*. Os cérebros foram dissecados a 4°C em solução salina fria, colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o uso. A análise de *western blot* foi realizada conforme descrito anteriormente (GONÇALVES *et al.*, 2017).

### 2.5.4.1 *Preparação das amostras*

As amostras foram homogeneizadas mecanicamente em 400 µl de tampão com 100 mM de NaF, 50 mM de Tris (pH 7,0), 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA, 0,1 mM de PMSF, 10% de glicerol e 1% de Triton X-100, além do coquetel inibidor de proteases *Amresco*<sup>®</sup> (concentração de trabalho 0,5 mM AEBSF, 0,3 µM de aprotinina, 50 µM de EDTA, 10 µM de bestatina, 10 µM de E-64, 10 µM de leupeptina). Posteriormente, os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4 °C) para eliminação dos restos celulares. Os sobrenadantes foram diluídos 1/1 (v/v) com solução Tris 100 mM (pH 6,8), EDTA 4 mM e SDS 8% e rapidamente colocados em banho seco a 100 °C durante 6 min. Em seguida, o tampão (40% de glicerol, 100 mM de Tris e azul de bromofenol, pH 6,8) foi adicionado a uma razão de 25:100 (v/v) bem como o β-mercaptoetanol a uma concentração final de 8%.

#### 2.5.4.2 *Dosagem de proteínas*

O conteúdo de proteína foi estimado pelo método de *Lowry* modificado descrito por Peterson (1977) usando albumina de soro bovino como padrão de proteína (PETERSON, 1977).

#### 2.5.4.3 *Eletroforese*

As amostras foram submetidas à eletroforese em mini géis de SDS-PAGE 10% ou 12% (eletroforese em gel de poliacrilamida 10% ou 12% contendo dodecil sulfato de sódio). A separação das proteínas foi realizada sempre aplicando a mesma quantidade de proteína (60 µg de proteína total por poço) de cada amostra, sendo utilizado para aplicação uma seringa Hamilton®.

#### 2.5.4.4 *Eletrotransferência*

Após a eletroforese, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência onde as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose usando um aparelho *semi-dry* (1,2 mA/cm<sup>2</sup>). Ao final, as membranas foram coradas com coloração de *Ponceau* 0,5% em ácido acético 1% para verificar a eficiência do processo de transferência.

#### 2.5.4.5 *Imunodeteção*

As membranas foram incubadas em uma solução de bloqueio contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA) em solução salina tamponada com Tris (TBS) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) por 1 h em temperatura ambiente. Os alvos foram detectados após incubação *overnight* (4 °C) com anticorpos específicos diluídos em TBS com 1% Tween-20 (TBS-T) contendo 2% BSA. Os anticorpos primários produzidos em coelho utilizados no estudo foram: fosfo-CREB (*Cell Signaling*®, 1: 1000), total-CREB (*Cell Signaling*®, 1: 1000), BDNF (*Santa Cruz Biotechnology*®, 1: 1000), Narp (*Thermo Scientific*®, 1: 1000), fosfo-GluA4 (*Thermo Scientific*®, 1: 1000), total-GluA4 (*Thermo Scientific*®, 1: 1000), fosfo-AKT (*Cell Signaling*®, 1: 1000), total-AKT (*Cell Signaling*®, 1: 1000), ERK1/2 total (*Sigma*®, 1: 10000) e os anticorpos primários produzidos em camundongo utilizados foram: fosfo-ERK1/2 (*Sigma*®, 1: 5000) e β-actina (*Santa Cruz Biotechnology*®, 1: 2500) conforme detalhado no Quadro 1. No

dia seguinte, as membranas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase correspondente anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo (*Millipore*<sup>®</sup> 1: 2500) para detectar proteínas por quimioluminescência intensificada.

Quadro 1. Anticorpos utilizados no estudo com amostras de roedores.

<b>Anticorpo</b>	<b>Peso Molecular (proteína alvo)</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante (n° catálogo)</b>
<b>AKT PAN</b>	60 KDa	1:1000	Cell Signaling (4685S)
<b>AKT Phospho (Ser473)</b>	60 KDa	1:1000	Cell Signaling (9271S)
<b>β-Actina</b>	43 KDa	1:5000	Santa Cruz (SC47778)
<b>BDNF</b>	14 KDa	1:1000	Santa Cruz (SC546)
<b>CREB Total</b>	45 KDa	1:1000	Cell Signaling (9197S)
<b>CREB Phospho (Ser133)</b>	45 KDa	1:1000	Cell Signaling (9198S)
<b>ERK 1/2 Total</b>	44/42 KDa	1:10000	Sigma (M5670)
<b>ERK 1 Phospho (Thr202/Tyr204) e ERK 2 Phospho (Thr183/Tyr185)</b>	44/42 KDa	1:5000	Sigma (M8159)
<b>GRIA4 Total</b>	100 KDa	1:1000	Thermo-Invitrogen (PA524217)
<b>GluR4 Phospho (Ser862)</b>	100 KDa	1:1000	Thermo-Invitrogen (PA536807)
<b>NPTX2</b>	47 KDa	1:1000	Thermo-Invitrogen (PA520521)

Após as etapas de bloqueio e incubação, as membranas foram lavadas três vezes (5 min) com TBS-T. Para detectar as formas fosforiladas e totais na mesma membrana, os imunocomplexos foram removidos com uma solução de NaOH 0,2N, conforme descrito anteriormente (FREITAS *et al.*, 2014; PERES *et al.*, 2013). As membranas sem imunocomplexos foram bloqueadas e seguiram as mesmas etapas descritas anteriormente. A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando o *software Image Lab*<sup>®</sup> 4.1 (*Bio-Rad Laboratories*). Os níveis de fosforilação foram determinados pela razão de DO das bandas fosforiladas sobre DO das bandas totais. Os imunocentúdos foram determinados pela razão de DO das bandas totais sobre a DO das bandas de β-actina. Os resultados estão expressos como valores relativos em comparação com o controle (100%). Os *imunoblots* mostrados nas figuras

correspondem a um experimento representativo que foi repetido sete vezes com resultados semelhantes.

### 2.5.5 Análise estatística

Todos os dados apresentados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As comparações entre os tratamentos e os grupos controle foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A análise estatística foi realizada no *Statistica*<sup>®</sup> (versão 7, *Software StatSoft*, Palo Alto, CA, EUA) e os gráficos foram construídos no *GraphPad Prism*<sup>®</sup> (versão 6, *GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA).

## 2.6 RESULTADOS

### 2.6.1 Padronização do anticorpo da Narp e dos testes comportamentais

Diante de um anticorpo nunca testado em nosso laboratório, preconizamos a padronização do mesmo para estabelecer com segurança a diluição adequada, tempo de incubação e tempo de exposição no fotodocumentador. Dessa forma, para acertar todos estes detalhes, testamos o anticorpo da Narp em diferentes amostras (**Fig. 10**). Percebemos que nas amostras de roedores a detecção era mais difícil e, assim, exigia um maior tempo de exposição das membranas no fotodocumentador.

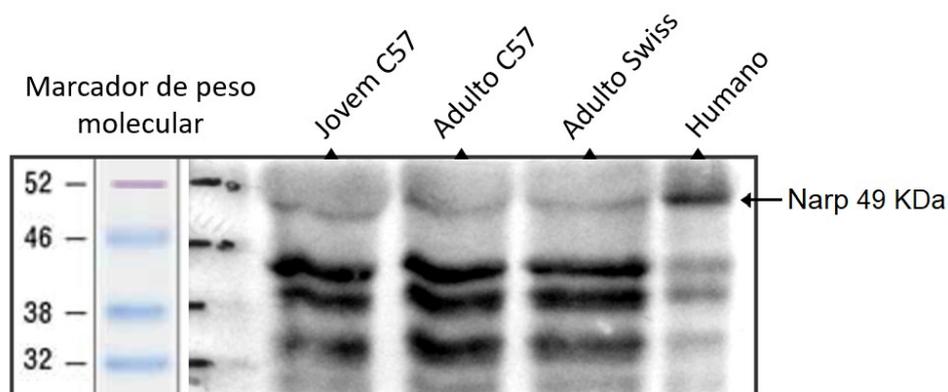


Fig. 10 Western blot representativo de Narp em diferentes espécies. Testamos o anticorpo em amostras de hipocampo de roedores (camundongos: jovem da linhagem C57, adulto da linhagem C57, adulto da

linhagem swiss) e humanos. Com base nos marcadores de pesos moleculares (à esquerda) e a especificidade do anticorpo denotada do *datasheet*, confirmamos o peso de 49 KDa da proteína Narp.

Além da padronização de protocolo para uso dos anticorpos, também realizamos testes iniciais (pilotos) dos testes comportamentais para ajustar os protocolos para as nossas condições de experimentação. Tendo em vista o nosso objetivo de avaliar os mecanismos neuroquímicos subjacentes aos tratamentos antidepressivos, o primeiro passo seria avaliar se os tratamentos são eficazes. Para termos certeza da eficácia dos tratamentos, ou seja, não obter falsos-positivos ou negativos, precisamos testar o protocolo de tratamento (manipulação dos animais, vias de administração das drogas, condições adequadas para os testes comportamentais, veículos utilizados etc.).

Assim, o primeiro teste consistiu em tratar os grupos de animais com os respectivos veículos e submetê-los aos testes comportamentais elegidos (Fig 11). Dessa forma, salina (i.p.), água (p.o.) e Tampão Hepar-Salina (i.c.v.) correspondem, respectivamente, aos veículos das drogas testadas posteriormente: cetamina, fluoxetina e ConBr. Através deste experimento inicial, além de testar os próprios veículos das drogas, também avaliamos as vias de administração (i.p., p.o. e i.c.v.) e, por isso, além dos 3 grupos tratados com veículos há um 4º grupo denominado “*sham*”. O grupo de animais “*sham*” não recebe nenhum tratamento, ou seja, esses animais não são submetidos a nenhum tipo manipulação (injeção i.p., gavagem ou injeção i.c.v.).

Observamos que não houve diferença entre os grupos testados no TNF (Fig. 11a) [F (3, 28) = 0,1424, p = 0,9336]. Além disso, nenhuma das vias de administração causou alteração na atividade locomotora espontânea de camundongos em comparação com o grupo *sham* [F (3, 26) = 0,1971, p = 0,8974] (Fig. 11b).

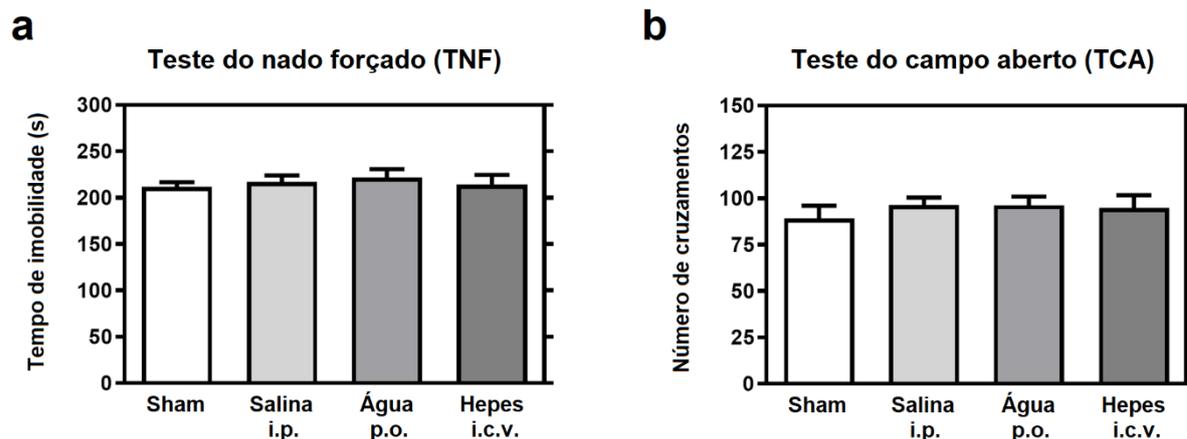


Fig. 11 O grupo *sham* e os grupos tratados com veículo não apresentaram diferenças nem no TNF nem no TCA. Nenhum dos grupos testados apresentou alterações nos testes comportamentais. Efeito das manipulações (tratamentos) ou não (*sham*) no tempo de imobilidade no TNF (**a**) e na atividade locomotora dos camundongos no TCA (**b**). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 7-8 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via.

### 2.6.2 O tratamento agudo com cetamina e com ConBr provoca um efeito tipo antidepressivo no TNF

Considerando que na literatura já está documentado o efeito tipo antidepressivo da cetamina (GARCIA *et al.*, 2008; KASTER *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013) e da ConBr (RIEGER *et al.*, 2014a) em modelos animais, inicialmente, avaliamos a eficácia dos tratamentos agudos com cetamina e ConBr no TNF. Camundongos tratados e controles foram avaliados no TNF (**Fig. 12a**) que é um teste preditivo, largamente utilizado para estudar a ação tipo antidepressiva de fármacos e outros compostos (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005; PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977). A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento [ $F(2, 26) = 13,75$ ,  $p < 0,0001$ ]. As análises *post-hoc* indicaram que a administração de cetamina 1 mg/kg (i.p.) e ConBr 10 mg/sítio (i.c.v.) foram capazes de diminuir o tempo de imobilidade no TNF ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), em comparação com animais controle. Além disso, conforme ilustrado na figura **12b**, os tratamentos não causaram qualquer alteração na atividade locomotora espontânea de camundongos [ $F(2, 26) = 1,679$ ,  $p = 0,2061$ ].

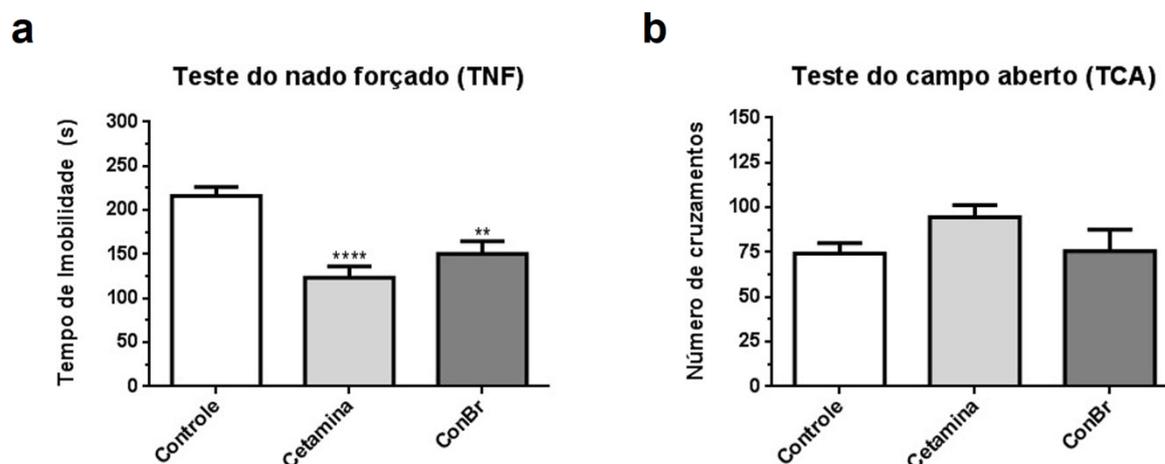


Fig. 12 O tratamento agudo com cetamina, assim como com ConBr produz um efeito tipo antidepressivo no TNF. Efeito do tratamento agudo com cetamina e com ConBr no tempo de imobilidade no TNF (**a**) e na atividade locomotora dos camundongos no TCA (**b**). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 9–10 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em comparação com o grupo controle (veículo).

### 2.6.3 Investigação das modulações da Narp e GluA4 diante de tratamentos agudos com cetamina e com ConBr

Tendo em vista as modulações já elucidadas da cetamina (KAVALALI; MONTEGGIA, 2012; RONALD S. DUMAN; AGHAJANIAN, 2012; SALVADORE; SINGH, 2013; ZANOS *et al.*, 2016) e também da lectina ConBr (RIEGER *et al.*, 2014a), decidimos avaliar a expressão de Narp frente ao tratamento com esses compostos. Além disso, consideramos importante verificar a expressão e fosforilação do receptor AMPA (subunidade GluA4) nessas condições.

Para avaliar essa modulação de proteínas de sinalização celular pelo tratamento com cetamina bem como com ConBr no HIP e CPF de camundongos, as amostras foram coletadas imediatamente após os testes comportamentais e avaliadas através da técnica de *western blot*. Nosso objetivo foi investigar os efeitos dos tratamentos agudos sobre o imunoconteúdo de Narp e na fosforilação da subunidade GluA4 do AMPAR. Ao analisar o imunoconteúdo de Narp, não encontramos alterações nem no HIP [ $F(2, 21) = 0,07329$ ,  $p = 0,9748$ ] nem no CPF [ $F(2, 21) = 0,1302$ ,  $p = 0,8786$ ] (**Fig. 13a**). Da mesma forma, não observamos alterações na taxa de fosforilação de GluA4 (fosfo-GluA4 Ser862/ total-GluA4) nem no HIP [ $F(2, 21) = 0,05280$ ,  $p = 0,9487$ ] nem no CPF [ $F(2, 21) = 0,02616$ ,  $p = 0,9742$ ] (**Fig. 13b**). O teor total de GluA4

(total-GluA4/ $\beta$ -actina) e o nível de fosforilação total da subunidade GluA4 Ser862 também não foram alterados nem no HIP nem no CPF (gráficos não mostrados).

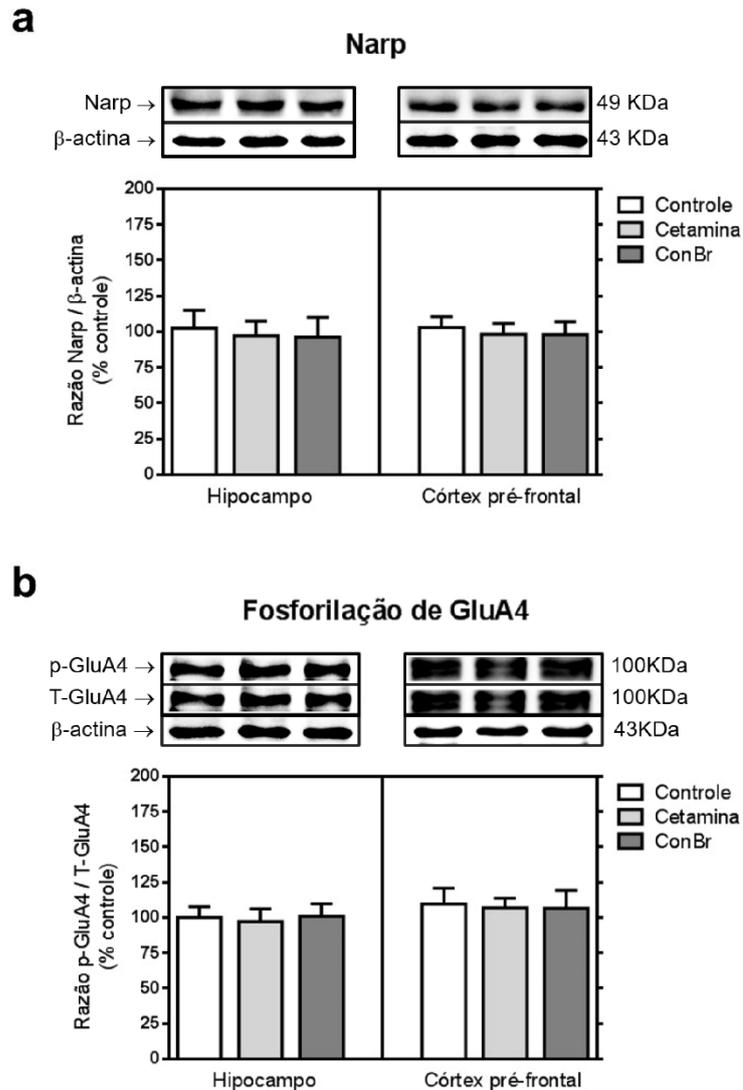


Fig. 13 A modulação de Narp e GluA4 após tratamento agudo com cetamina e com ConBr. **(a)** Western blot representativo do imunocntéudo de Narp e  $\beta$ -actina; e quantificação da expressão de Narp. **(b)** Western blot representativo de fosfo-GluA4 (p-GluA4), GluA4 total (T-GluA4) e imunocntéudo de  $\beta$ -actina (controle de carga); e quantificação da fosforilação de GluA4 (Ser862). Cada gráfico de barras expressa dados do HIP (esquerda) e do CPF (direita). Os resultados são apresentados como porcentagem do controle (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 8 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via.

Tendo em vista as alterações dinâmicas de sinalização celular, resolvemos observar a modulação das proteínas em tempos distintos: 8h, 18h e 24h após os tratamentos. Com relação

à proteína Narp, ao analisarmos o HIP, cetamina e ConBr não alteraram seu imunoc conteúdo 8h [F (2, 21) = 0,5547, p = 0,5824] (**Fig. 14b**), 18h [F (2, 21) = 0,03471, p = 0,9659] (**Fig. 14c**) ou 24h [F (2, 21) = 0,2324, p = 0,7947] (**Fig. 14d**) após os tratamentos. Da mesma forma, ao analisarmos o CPF, cetamina e ConBr não alteraram o imunoc conteúdo de Narp 8h [F (2, 21) = 0,3279, p = 0,7240] (**Fig. 14b**), 18h [F (2, 21) = 0,4623, p = 0,6361] (**Fig. 8c**) ou 24h [F (2, 21) = 0,1033, p = 0,9023] (**Fig. 14d**) após os tratamentos.

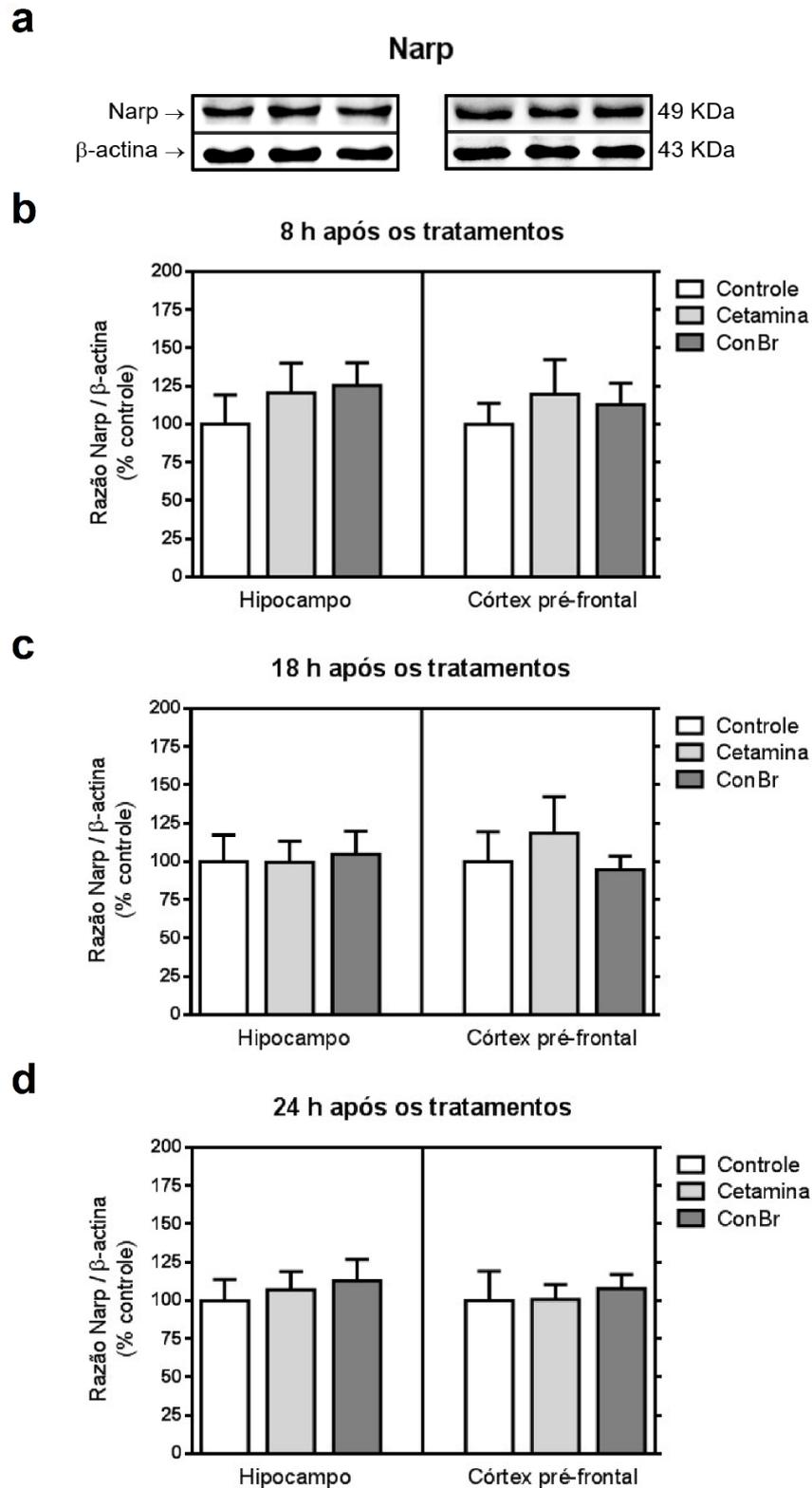


Fig. 14 A expressão de Narp após tratamento de 8, 18 e 24h com cetamina e com ConBr. **(a)** Western blot representativo do imunocônteuído de Narp e de β-actina (controle de carga). Quantificação da expressão de Narp, em relação a β-actina, 8h **(b)**, 18h **(c)** e 24h **(d)** após o tratamento. Cada gráfico de barras expressa dados do HIP (esquerda) e do CPF (direita). Os resultados são apresentados como

porcentagem do controle (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 8 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via.

Quando analisamos a subunidade GluA4 do receptor AMPA (**Fig. 15**), também não encontramos alterações. Com relação ao HIP, cetamina e ConBr não alteraram a taxa de fosforilação da subunidade Ser862 de GluA4 (fosfo-GluA4/total-GluA4) 8h [F (2, 21) = 0,6941,  $p = 0,5106$ ] (**Fig. 15b**), 18h [F (2, 21) = 0,1153,  $p = 0,8916$ ] (**Fig. 15c**), ou 24h [F (2, 21) = 0,07703,  $p = 0,9261$ ] (**Fig. 9d**) após os tratamentos. Da mesma forma, ao analisarmos o CPF, cetamina e ConBr não alteraram a taxa de fosforilação da subunidade Ser862 de GluA4 (fosfo-GluA4/total-GluA4) 8h [F (2, 21) = 0,2367,  $p = 0,7913$ ] (**Fig. 15b**), 18h [F (2, 21) = 0,06540,  $p = 0,9369$ ] (**Fig. 15c**), ou 24h [F (2, 21) = 0,04083,  $p = 0,9601$ ] (**Fig. 15d**) após os tratamentos. Também não houve alteração do conteúdo total de GluA4 e do nível de fosforilação total da subunidade GluA4 Ser862 nem no HIP nem no CPF em nenhum dos tempos analisados (gráficos não mostrados).

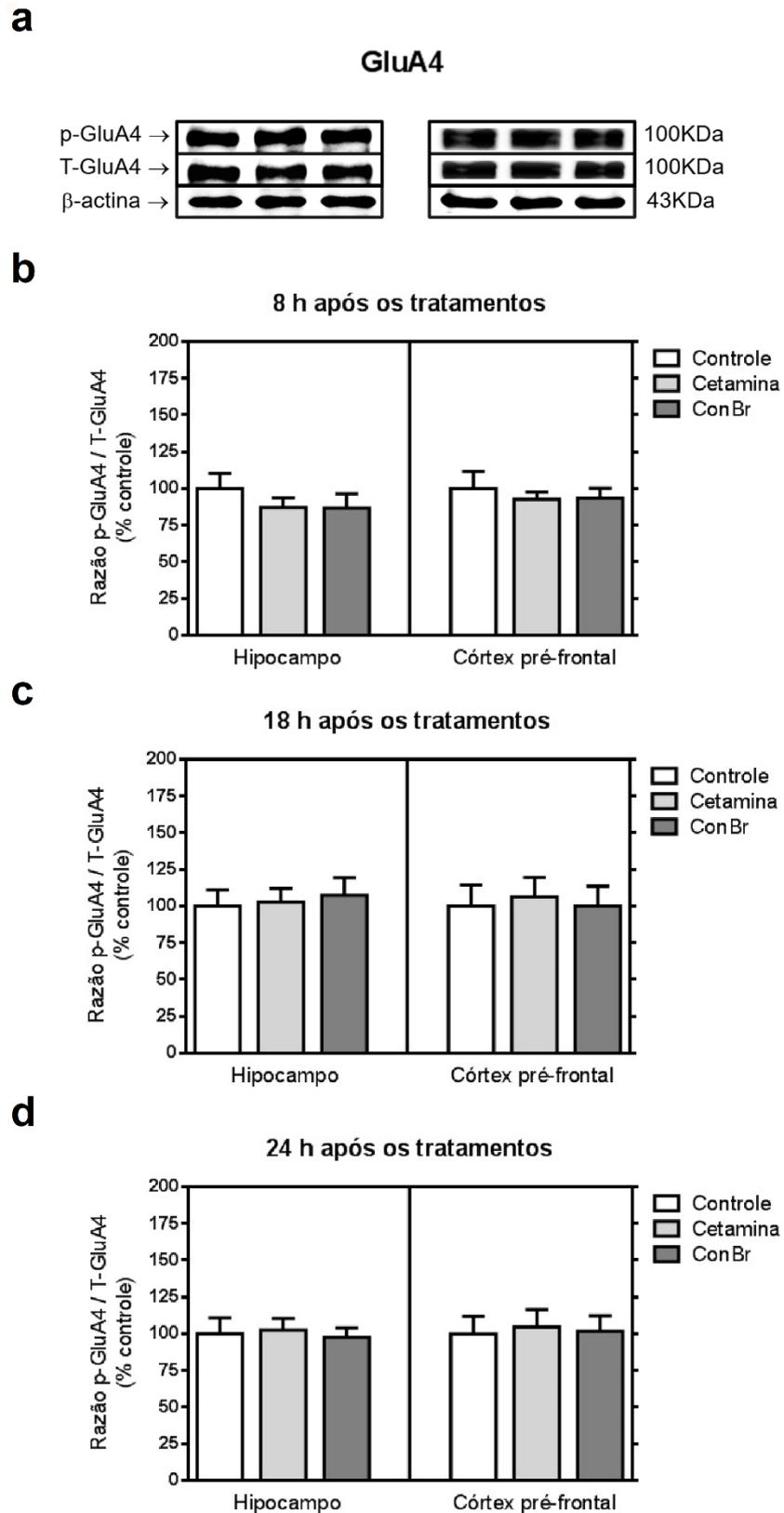


Fig. 15 A fosforilação de GluA4 após tratamento de 8, 18 e 24h com cetamina e com ConBr. **(a)** Western blot representativo de fosfo-GluA4 (p-GluA4), GluA4 total (T-GluA4) e imunocnteúdo de β-actina (controle de carga). Quantificação da taxa de fosforilação de GluA4 8h **(b)**, 18h **(c)** e 24h **(d)** após o

tratamento. Cada gráfico de barras expressa dados do HIP (esquerda) e do CPF (direita). Os resultados são apresentados como porcentagem do controle (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 8 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via.

#### 2.6.4 O tratamento crônico com fluoxetina provoca um efeito tipo antidepressivo no TNF

O primeiro passo foi estabelecer que o tratamento crônico com fluoxetina era eficaz. Portanto, os animais tratados e controles foram avaliados no TNF (**Fig. 16a**). A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento [ $F(3, 27) = 4,879$ ,  $p < 0,01$ ]. As análises *post-hoc* indicaram que a administração crônica de fluoxetina produziu um efeito dose-dependente no TNF. As doses de 1 e 10 mg/kg (p.o.) foram capazes de diminuir o tempo de imobilidade no TNF ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), em comparação com animais tratados com veículo. A dose de 0,1 mg/kg não produziu efeito do tipo antidepressivo. Além disso, conforme ilustrado na figura **16b**, o tratamento crônico com fluoxetina não causou qualquer alteração na atividade locomotora espontânea dos camundongos [ $F(3, 27) = 1,214$ ,  $p = 0,3237$ ]. Esse conjunto de dados foi importante para validar os efeitos tipo antidepressivo da fluoxetina, reforçando que sua ação foi específica, e não devido a uma alteração locomotora.

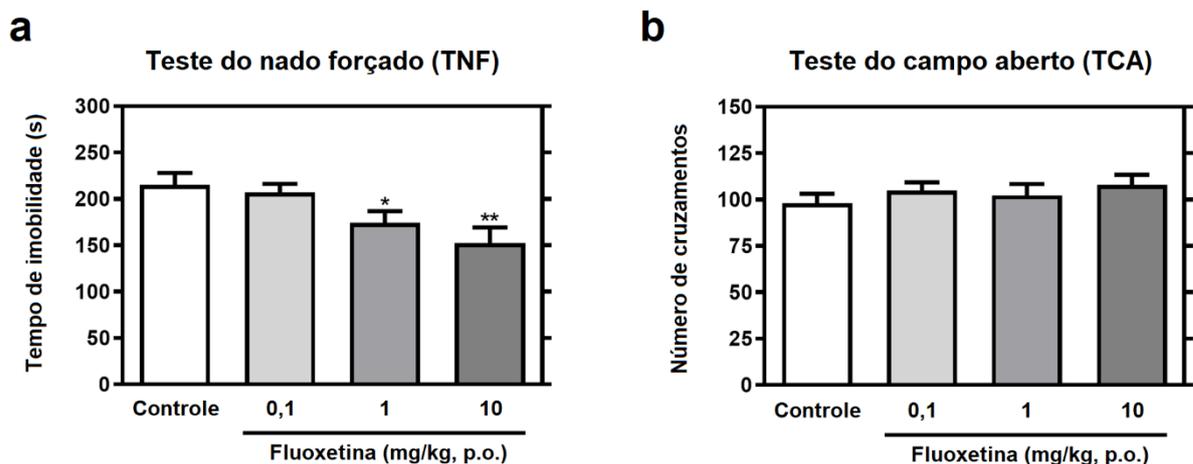


Fig. 16 O tratamento crônico com fluoxetina produz um efeito tipo antidepressivo no TNF. **(a)** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina no TNF. **(b)** Atividade locomotora dos camundongos no TCA. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  EPM de 7–9 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  em comparação com o grupo controle (veículo).

### 2.6.5 O tratamento crônico com fluoxetina diminui a expressão de GluA4 e regula proteínas-chave para a sinaptogênese e plasticidade sináptica

Para determinar a possível modulação de proteínas de sinalização celular pelo tratamento oral e crônico com fluoxetina no HIP e CPF de camundongos, as amostras foram avaliadas através da técnica de *western blot*. Inicialmente, nosso objetivo foi investigar os efeitos da fluoxetina sobre o conteúdo e a fosforilação da subunidade GluA4 do AMPAR. Ao analisar o conteúdo total de GluA4 (total-GluA4/ $\beta$ -actina), foi observado um efeito significativo do tratamento com fluoxetina [ $F(3, 24) = 6,658, p < 0,01$ ] (**Fig. 17b**) no CPF. As análises *post-hoc* indicaram que a administração crônica de fluoxetina produziu um efeito dose-dependente, em que a fluoxetina administrada na dose de 1 mg/kg e 10 mg/kg diminuiu significativamente a expressão das subunidades GluA4 ( $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente), em comparação com animais tratados com veículo. É importante ressaltar que o declínio do teor total de GluA4 (total-GluA4/ $\beta$ -actina) foi acompanhado por uma diminuição do nível de fosforilação total da subunidade GluA4 Ser862, uma vez que um efeito significativo também foi observado com o tratamento com fluoxetina (1 e 10 mg/kg, p.o.) em fosfo-GluA4 Ser862/ $\beta$ -actina [ $F(3, 24) = 7,241, p < 0,01$ ] (**Fig. 17c**) no CPF. A dose de 0,1 mg/kg não causou alteração. Em contrapartida, no HIP não observamos alteração na expressão das subunidades GluA4; a ANOVA de uma via não revelou alterações significativas no imunoconteúdo de GluA4 [ $F(3, 24) = 0,3654, p = 0,7785$ ]. Um aspecto interessante observado foi que a taxa de fosforilação da subunidade Ser862 de GluA4 (fosfo-GluA4/total-GluA4) não foi alterada pelo tratamento com fluoxetina, nem no HIP [ $F(3, 24) = 0,4772, p = 0,7011$ ] nem no CPF [ $F(3, 24) = 0,5054, p = 0,6822$ ] (**Fig. 17d**).

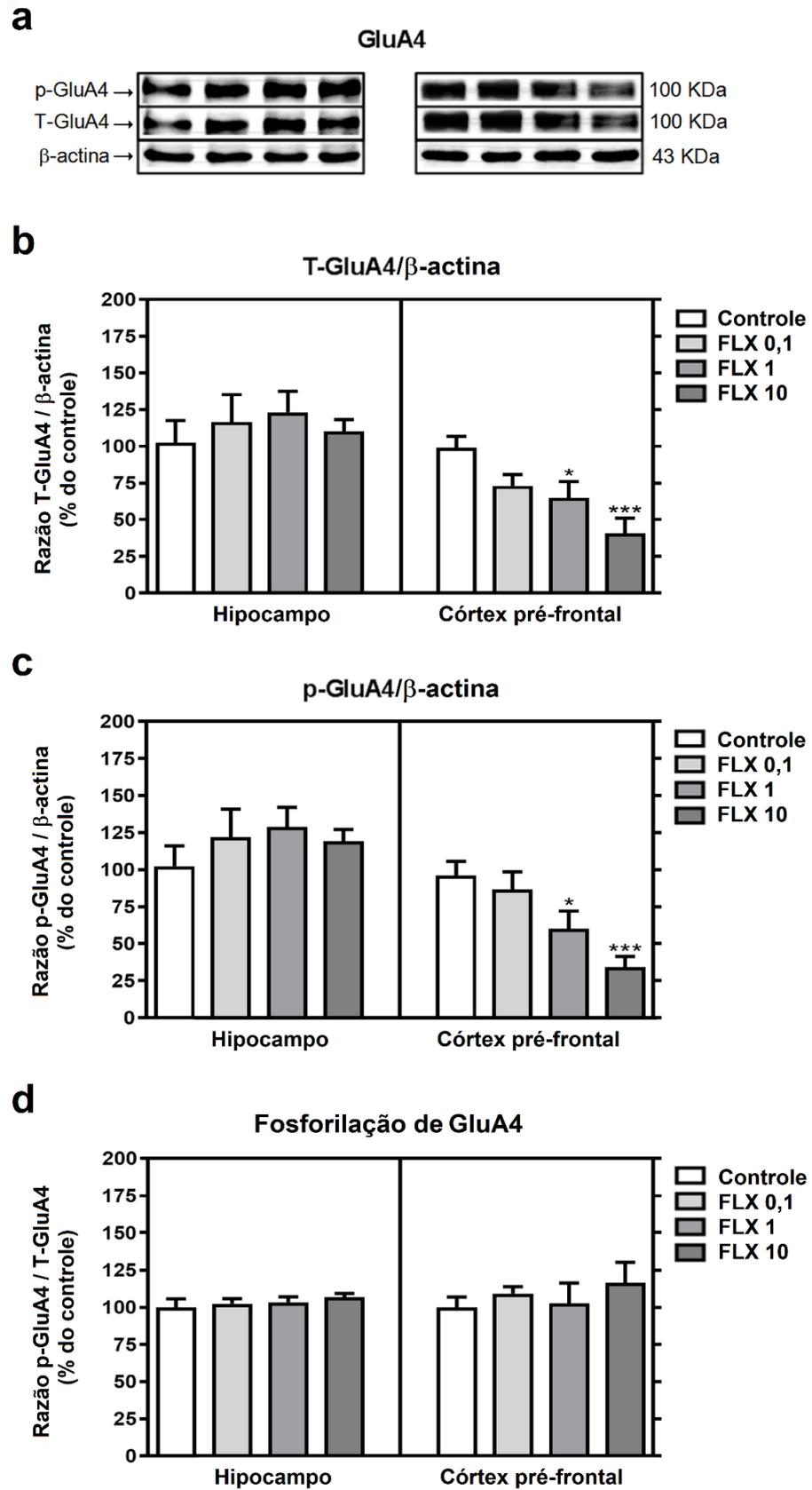


Fig. 17 O tratamento crônico com fluoxetina diminui a expressão de GluA4. (a) Western blot representativo de fosfo-GluA4 (p-GluA4), GluA4 total (T-GluA4) e imunocônteuo de β-actina

(controle de carga). **(b)** Quantificação da expressão de GluA4 e **(c)** quantificação da fosforilação de GluA4 (Ser862). **(d)** Quantificação da taxa de fosforilação de GluA4 (Ser862). Cada gráfico de barras expressa dados do HIP (esquerda) e do CPF (direita). Os resultados são apresentados como porcentagem do controle (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação com o grupo controle (veículo).

No próximo conjunto de experimentos, avaliamos a modulação de Narp (**Fig. 18**) e observamos um aumento significativo na expressão dessa proteína no HIP [F (3, 24) = 3,644,  $p < 0,05$ ], confirmado por análise *post-hoc*, que indicou que a administração crônica de fluoxetina na dose de 10 mg/kg (p.o.) aumentou a expressão de Narp ( $p < 0,05$ ). No CPF a ANOVA de uma via revelou uma mudança significativa na expressão desta proteína [F (3, 24) = 2,286,  $p < 0,05$ ]. Por meio da análise *post-hoc*, observamos uma diminuição significativa da expressão de Narp no CPF em virtude do tratamento com fluoxetina 10 mg/kg ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 18**).

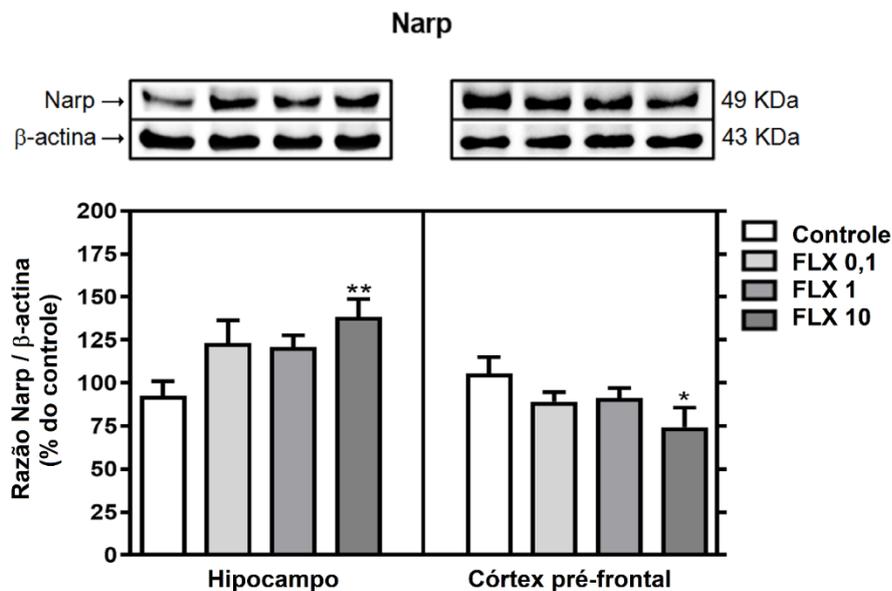


Fig. 18 O efeito do tratamento crônico com fluoxetina na modulação de Narp. Western blot representativo do imunoconteúdo de Narp e de  $\beta$ -actina; e quantificação da expressão de Narp. Cada gráfico de barras expressa dados do HIP (esquerda) e CPF (direita). Os resultados estão apresentados como porcentagem de controle (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  em comparação com o grupo controle (veículo).

Com o objetivo de caracterizar que o tratamento com fluoxetina estava sendo efetivo na modulação de proteínas tipicamente envolvidas na sinaptogênese e na plasticidade sináptica, e com papel reconhecido no mecanismo de resposta frente à fluoxetina, foram avaliados os seguintes alvos: BDNF (KOWIAŃSKI *et al.*, 2018; PARK; POO, 2013; THOENEN, 1995), o fator de transcrição CREB, que pode mediar a expressão do BDNF (FLAVELL; GREENBERG, 2008), bem como as proteínas cinases AKT e ERK1/2 (DUMAN; VOLETI, 2012; HSIUNG *et al.*, 2003; MATSUDA *et al.*, 2019; WANG; MAO, 2019).

Em relação aos resultados de CREB (**Fig. 19a**), a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento com fluoxetina tanto no HIP [ $F(3, 24) = 1,980, p < 0,05$ ] quanto no CPF [ $F(3, 24) = 1,764, < 0,05$ ]. A análise *post-hoc* indicou que a administração crônica de fluoxetina (10 mg/kg) causou um aumento na fosforilação na Ser133 de CREB no HIP ( $p < 0,05$ ) e no CPF ( $p < 0,05$ ). Além disso, a figura **19b** mostra os efeitos da fluoxetina no imunocentudo de BDNF. ANOVA de uma via revelou um aumento significativo de BDNF provocado pela fluoxetina em ambos HIP [ $F(3, 24) = 3,189, p < 0,05$ ] e CPF [ $F(3, 24) = 5,172, p < 0,01$ ]. A análise *post-hoc* indicou que a administração crônica de fluoxetina (10 mg / kg) aumentou significativamente a expressão do BDNF no HIP ( $p < 0,01$ ) e no CPF ( $p < 0,05$ ).

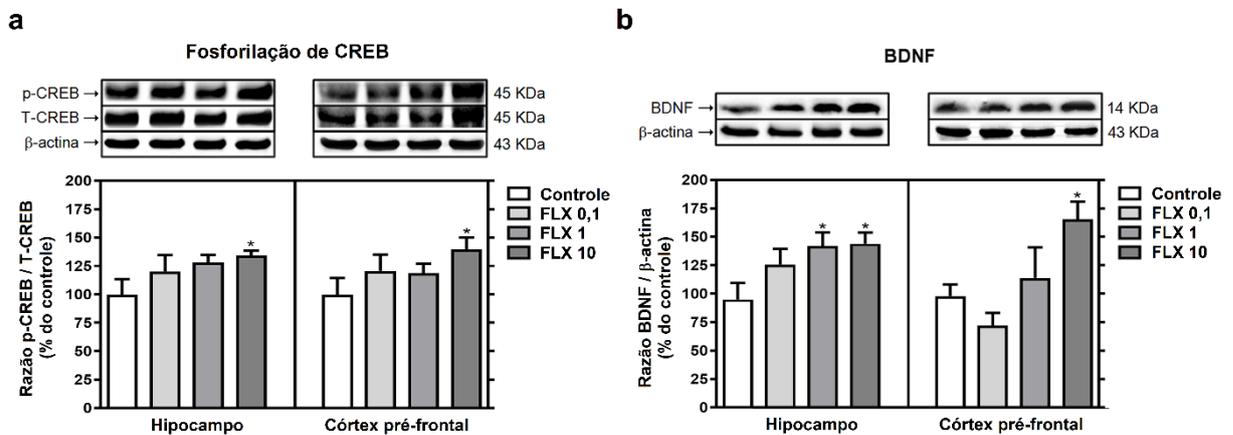


Fig. 19 O tratamento crônico com fluoxetina aumenta a fosforilação de CREB e BDNF. **(a)** Western blot representativo de fosfo-CREB (p-CREB), CREB total (T-CREB) e imunocentudo de  $\beta$ -actina (controle de carga); e quantificação da fosforilação CREB (Ser133). **(b)** Western blot representativo do imunocentudo de BDNF e de  $\beta$ -actina; e quantificação da expressão do BDNF. Cada gráfico de barras expressa dados do HIP (esquerda) e CPF (direita). Os resultados são apresentados como porcentagem do controle (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle (veículo).

No próximo conjunto de experimentos, foi avaliada a modulação de AKT e ERK1/2 em resposta ao tratamento com fluoxetina. Com relação à fosforilação de AKT, a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento com fluoxetina no HIP [F (3, 24) = 2,463,  $p < 0,05$ ], mas não no CPF [F (3, 24) = 2,248,  $p = 0,1086$ ] (**Fig. 20a**). A análise *post-hoc* indicou que o tratamento com fluoxetina 10 mg/kg aumentou a fosforilação de AKT do hipocampo em Ser473 ( $p < 0,05$ ). Em relação à modulação de ERK1/2 (**Fig. 20b**) a ANOVA de uma via não revelou alterações significativas de fosforilação de ERK1 (Thr 202/Tyr 204) nem no HIP [F (3, 24) = 0,3172,  $p = 0,8128$ ] nem no CPF [F (3, 24) = 0,3042,  $p = 0,8221$ ] (**Fig. 20c**). Da mesma forma, a figura **20d** mostra que o tratamento crônico com fluoxetina não produziu alterações nos níveis de fosforilação de ERK2 (Thr 183/Tyr 185) nem no HIP [F (3, 24) = 0,4894,  $p = 0,6929$ ] nem no CPF [F (3, 24) = 0,08310,  $p = 0,9686$ ].

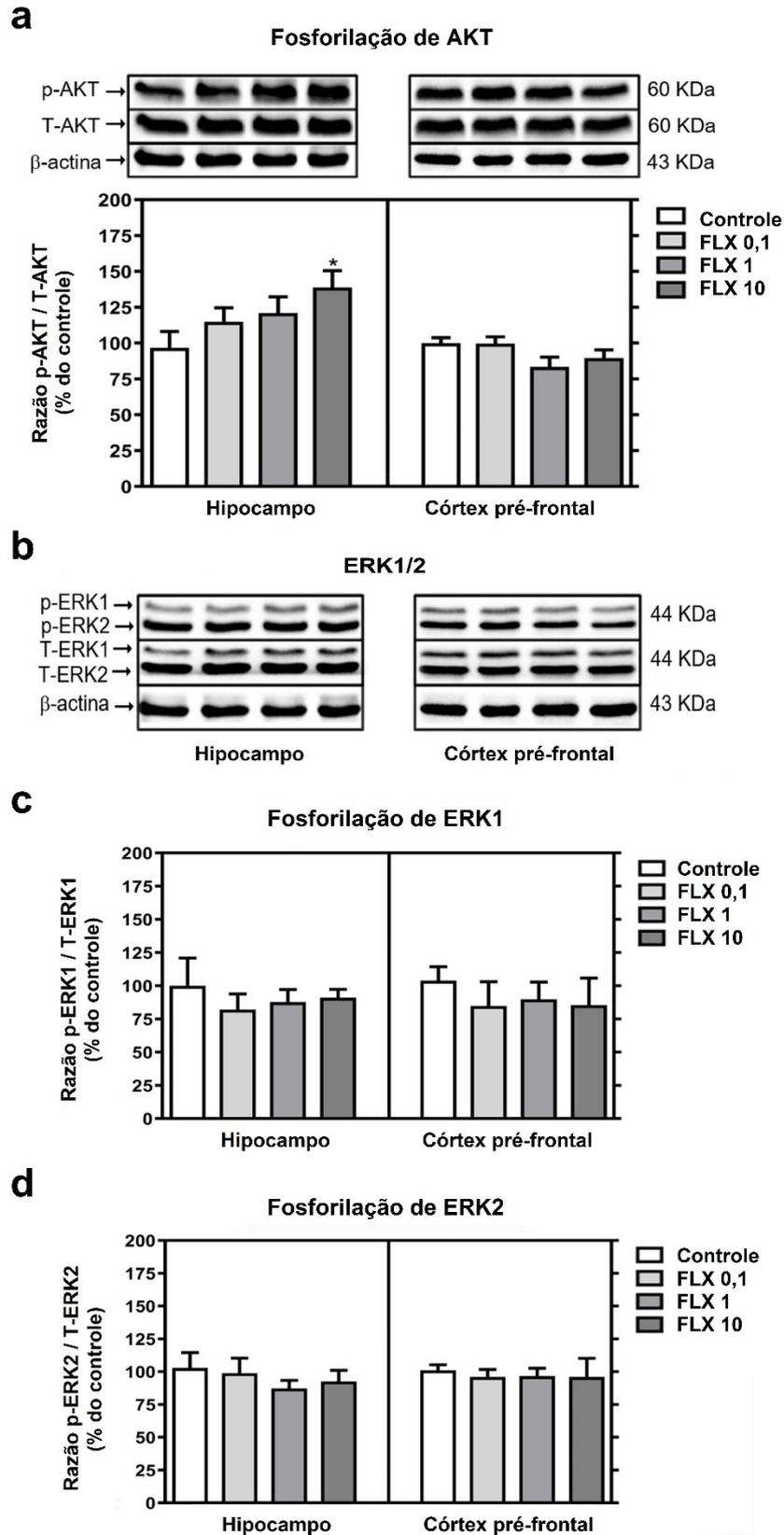


Fig. 20 A fosforilação de AKT e ERK1/2 após tratamento crônico com fluoxetina. (a) Western blot representativo de fosfo-AKT (p-AKT), AKT total (T-AKT) e imunocônteuído de β-actina (controle de carga); e quantificação da fosforilação de AKT (Ser473). (b) Western blot representativo de fosfo-ERK1

(p-ERK1), fosfo-ERK2 (p-ERK2), ERK1 total (T-ERK1), ERK2 total (T-ERK2) e imunocônteúdo de  $\beta$ -actina (controle de carga). **(c)** e **(d)** Quantificação de fosforilação ERK1 (Thr202/Tyr204) e de ERK2 (Thr183/Tyr185), respectivamente. Cada gráfico de barras expressa dados do HIP (esquerda) e CPF (direita). Os resultados estão apresentados como porcentagem do controle (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 7 animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo controle (veículo).

Assim, a síntese de resultados que obtivemos com relação ao tratamento crônico com fluoxetina está apresentada na figura 21. Como outros estudos da literatura, encontramos aumento da fosforilação CREB e conteúdo de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal em resposta ao tratamento com fluoxetina. Além disso, foi observada ativação de AKT e aumento do conteúdo de Narp no hipocampo, enquanto o conteúdo de Narp diminuiu no córtex pré-frontal acompanhando uma redução expressiva do conteúdo de GluA4 nesta área.

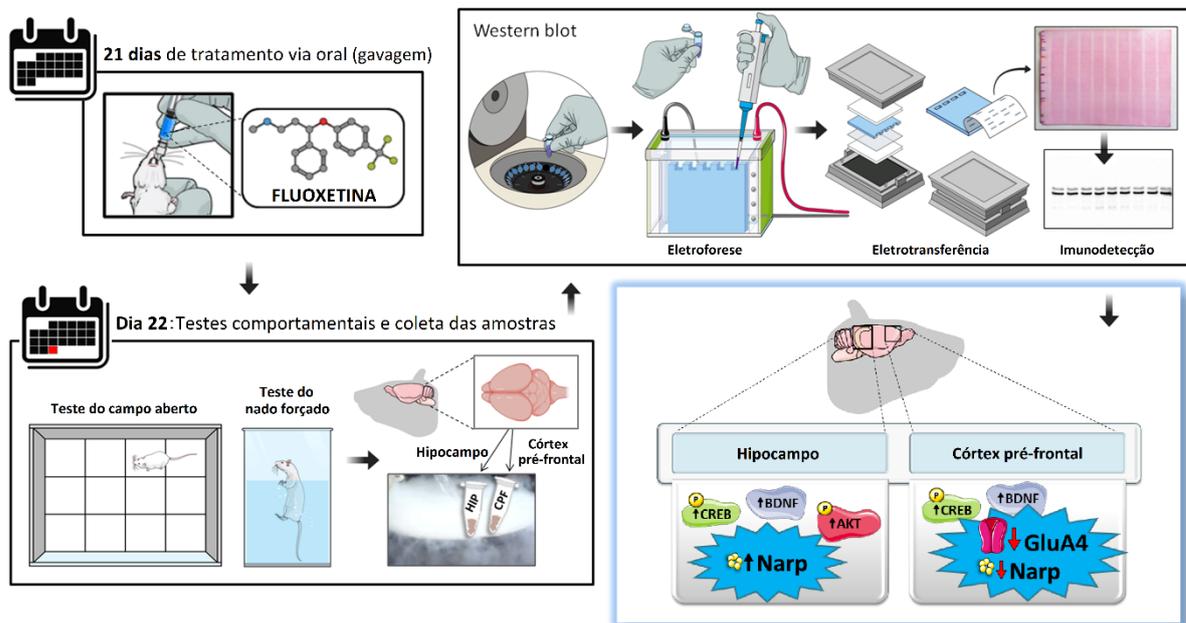


Fig. 21 Representação esquemática do protocolo experimental e principais resultados. As etapas do protocolo de tratamento crônico com fluoxetina até a avaliação comportamental e bioquímica estão apresentadas de forma esquemática. Figura elaborada com algumas imagens do *Mind the Graph*®.

## 2.7 DISCUSSÃO

Um estudo de grande impacto (ZANOS *et al.*, 2016) mostrou que o mecanismo de ação antidepressivo de cetamina poderia ocorrer através de um metabólito (2S,6S;2R,6R)-hidroxinorcetamina (HNK), estimulando a expressão de BDNF e modulando receptores AMPA, sem um aparente envolvimento de receptores NMDA. Estes achados fortalecem os receptores AMPA como possíveis alvos para ação antidepressiva rápida. Apesar dessas evidências apontarem para possíveis modulações de subunidades do AMPAR como a GluA4, não encontramos alterações no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos tratados com cetamina.

A resposta neuronal em muitas áreas do cérebro, incluindo o córtex cerebral e o hipocampo, são coordenadas pelo equilíbrio entre os impulsos sinápticos inibitórios e excitatórios coativados (ISAACSON; SCANZIANI, 2011; SOHAL; RUBENSTEIN, 2019; YANG; SUN, 2018). A neurotransmissão inibitória e excitatória e seu equilíbrio são críticos para a homeostase neuronal; e, portanto, para uma função cerebral normal (FERGUSON; GAO, 2018). Consequentemente, a identificação e a caracterização funcional dos elementos moleculares cruciais em entradas excitatórias e inibitórias é uma etapa crítica para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para muitas doenças neurológicas. Dado esse contexto, lançamos um olhar sobre moléculas pouco exploradas na neurobiologia do TDM, bem como nas respostas que permeiam o tratamento com antidepressivos. Dessa forma, o estudo sugere um novo horizonte de alvos importantes a serem considerados nestes processos.

Nas últimas décadas, o TNF tem sido usado como um teste de desespero comportamental preditivo para avaliar a atividade antidepressiva. Neste paradigma, os roedores são submetidos a uma situação aguda de estresse inevitável, e uma redução no tempo de imobilidade é considerada um indicativo de atividade antidepressiva (PORSOLT *et al.*, 1978). Apesar das limitações associadas a este teste, principalmente por ter apenas validade preditiva, o TNF é amplamente utilizado no estudo de compostos antidepressivos e seus mecanismos de ação (PETIT-DEMOULIERE; CHENU; BOURIN, 2005). No entanto, compostos que aumentam a atividade locomotora em animais podem induzir um resultado falso positivo no TNF. Para excluir essa possibilidade, todos os animais foram submetidos ao TCA, e nenhum dos tratamentos alterou significativamente a locomoção do animal, validando os resultados obtidos no TNF (**Fig. 12 e 16**). Os dados visualizados na **Fig. 16** confirmaram resultados anteriores da literatura (CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005; DETKE; JOHNSON; LUCKI, 1997;

SLATTERY; CRYAN, 2012), que indicou que o tratamento crônico com fluoxetina é capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TNF sem alterar a locomoção do animal no TCA. Mediante esses resultados positivos, passamos para a análise bioquímica.

Um resultado fundamental do presente estudo é a demonstração de que o tratamento crônico com fluoxetina promove uma diminuição significativa da subunidade GluA4 do AMPAR no CPF (**Fig. 17b**). Além disso, o nível de fosforilação de fosfo-GluA4 (Ser862) também diminuiu na mesma magnitude (**Fig. 17c**), acompanhando a perda do conteúdo total. Esse resultado explica a observação de que a taxa de fosforilação do GluA4, por si só, não foi alterada no CPF em resposta à fluoxetina (**Fig. 17d**). É importante enfatizar que o gene GluA4 é regulado positivamente no cérebro de pacientes deprimidos (DURIC *et al.*, 2013). Além disso, foi visto em culturas organotípicas de hipocampo de rato que a inserção sináptica de subunidades GluA4 é conduzida pela proteína cinase A (PKA) por meio da fosforilação no resíduo Ser842 (ESTEBAN *et al.*, 2003). Essa mobilização de AMPARs em direção às sinapses é o mecanismo predominante para o fortalecimento sináptico (ATANASOVA; KHARYBINA; KAARELA, 2019). Dada a diminuição significativa de GluA4 e seu papel como um receptor que pode ativar neurônios GABAérgicos PV+ no CPF (MAHESHWARI; NAHM; NOBELS, 2013; PELKEY *et al.*, 2015), podemos supor que o tratamento crônico com fluoxetina pode diminuir o tônus GABAérgico levando a um aumento do tônus glutamatérgico nessa área do cérebro. Um aumento na neurotransmissão do glutamato pré-frontal induz uma série de processos intracelulares como a ativação pós-sináptica das vias de sinalização relacionadas à neuroplasticidade (DUMAN *et al.*, 2016) e está bem estabelecido que a sinaptogênese e a plasticidade neuronal são mecanismos criticamente envolvidos nos efeitos antidepressivos (CASTRÉN; HEN, 2013).

Nossos resultados também mostram um aumento na expressão de Narp no hipocampo de camundongos tratados cronicamente com 10 mg/kg de fluoxetina. Esse dado corrobora o fato de que a expressão do gene Narp aumenta justamente no hipocampo (MARIGA *et al.*, 2015). Desde a descoberta de Narp (TSUI *et al.*, 1996), foi relatado que o hipocampo parece ser uma estrutura muito promissora na detecção de diferentes reguladores desta proteína (CHANG *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2017; O'BRIEN *et al.*, 1999; RETI *et al.*, 2002; RETI; BARABAN, 2000) e que Narp desempenha um papel essencial no controle das propriedades da rede hipocampal (PELKEY *et al.*, 2015). Por outro lado, no CPF, os resultados indicaram que o tratamento com fluoxetina promoveu uma diminuição no conteúdo de Narp (**Fig. 18**). Uma possível explicação para essa diminuição de Narp poderia estar relacionada à diminuição

maciça de GluA4 e fosfo-GluA4 no CPF de camundongos tratados com fluoxetina (**Fig. 18b e c**). Em relação a este conjunto de resultados, é fundamental destacar que cada região cerebral exibe um padrão único de expressão gênica após o tratamento antidepressivo crônico (ALME *et al.*, 2007). Narp parece estar envolvido em patologias como a depressão, mas ainda não está claro como ou em que magnitude (CHAPMAN; SHANMUGALINGAM; SMITH, 2020). Para elucidar as diferenças na expressão de Narp no hipocampo e no CPF, estudos futuros utilizando técnicas de imunohistoquímica, PCR e transcriptômica serão necessários.

Narp foi relatado como um IEG contendo o elemento regulador de ação cis CRE (elemento de resposta cAMP), que é o alvo transcricional direto da ativação do fator de transcrição CREB em resposta, por exemplo, à sinalização de BDNF (MARIGA *et al.*, 2015). Além disso, o fator de transcrição CREB está envolvido na expressão de BDNF, considerando que seu gene apresenta o elemento CRE, sendo este processo bem reconhecido como uma etapa molecular importante para a plasticidade neuronal e sinaptogênese (CASTRÉN; HEN, 2013; FLAVELL; GREENBERG, 2008; FUMAGALLI *et al.*, 2005; MARSDEN, 2013; THOENEN, 1995). A eficácia da administração crônica de medicamentos antidepressivos envolve a regulação da expressão gênica de longo prazo por meio da modulação de uma diversidade de vias de sinalização (HASSANI *et al.*, 2014; JIN *et al.*, 2017). O fator de transcrição CREB, por exemplo, e um de seus genes-alvo, BDNF, podem inclusive mediar respostas terapêuticas a antidepressivos. Aqui, após investigar essas proteínas, observamos um aumento na fosforilação de CREB (Ser133) no CPF e no HIP após o tratamento crônico com fluoxetina (**Fig. 19a**). Da mesma forma, em ambas as estruturas, observamos um aumento na expressão do BDNF (**Fig. 19b**). Nesse sentido, é importante destacar que os pacientes com TDM apresentam expressão diminuída de RNAm de CREB no córtex temporal (DOWLATSHAHI *et al.*, 1998) e níveis corticais de BDNF diminuídos (CHEN *et al.*, 2001) conforme avaliado em amostras *post mortem*. A administração crônica, mas não aguda com antidepressivos convencionais, aumenta significativamente a expressão do BDNF tanto no CPF quanto no HIP (CALABRESE *et al.*, 2011; COPPELL; PEI; ZETTERSTRÖM, 2003; NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995). Portanto, os aumentos de CREB e BDNF pelo tratamento com fluoxetina em nosso estudo estão de acordo com o papel do BDNF e CREB na neurobiologia do TDM e na resposta antidepressiva (CASTRÉN; KOJIMA, 2017; DUMAN; MONTEGGIA, 2006; NIBUYA; NESTLER; DUMAN, 1996; RAFA-ZABŁOCKA *et al.*, 2018).

É bem conhecido que o BDNF via TrkB pode ativar diversas vias de sinalização que levam à modulação de muitos alvos proteicos, incluindo o fator de transcrição CREB

(CARLEZON; DUMAN; NESTLER, 2005). Assim, a cascata de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fosfatidilinositol-3-cinase/proteína cinase B (PI3K/AKT) podem ser ativadas por BDNF via TrkB (HUANG; REICHARDT, 2003; MARSDEN, 2013; WANG; MAO, 2019). Cabe ressaltar que os níveis de TrkB e a atividade de seus alvos *downstream* (por exemplo, ERK e AKT) são reduzidos em indivíduos suicidas (CASTRÉN; KOJIMA, 2017). No presente estudo, mostramos que a administração de fluoxetina (10 mg / kg, p.o.) induziu um aumento na fosforilação de AKT no HIP de camundongos (**Fig. 20a**). Após a fosforilação, AKT torna-se ativo e, ao modular as proteínas alvo, facilita a sobrevivência celular, bloqueando a morte celular apoptótica, sendo uma enzima de sinalização celular envolvida nas respostas comportamentais de vários antidepressivos (BEAULIEU, 2012; DALMAGRO *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2018). Analisando o CPF, não encontramos alterações na taxa de fosforilação desta proteína. No entanto, é importante destacar que o CPF e o HIP apresentam diferentes tipos de células e particularidades fisiológicas e metabólicas (CARLÉN, 2017; KNIERIM, 2015; SIGURDSSON; DUVARCI, 2016; XU *et al.*, 2019), que poderia justificar as diferenças regionais observadas.

É interessante destacar que os antidepressivos não monoaminérgicos, como a cetamina e outros compostos antidepressivos de ação rápida, também ativam a sinalização AKT/mTORC1 e aumentam a expressão do BDNF de maneira aguda, promovendo melhora da densidade e conectividade sináptica. Os mecanismos subjacentes a essa ação ainda estão em debate, mas podem envolver uma inibição primária de NMDARs localizados em interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos, causando uma diminuição de seu impulso inibitório nas células piramidais no hipocampo e no córtex pré-frontal, um efeito que aumenta a excitabilidade das células piramidais promovendo a ativação subsequente das vias de sinalização trófica (DUMAN, 2014a; DUMAN; SANACORA; KRYSTAL, 2019)(Duman 2014; Duman et al. 2019a; Widman e McMahon 2020).

ERK1/2 foram principalmente investigadas e caracterizadas no SNC e na fisiopatologia do TDM (WANG; MAO, 2019). Aqui, como mostrado na Fig. **20c e d**, nenhuma alteração foi detectada na atividade dessas proteínas nem no HIP nem no CPF. Isso pode ser devido ao fato de que a fosforilação dessas proteínas é transitória e existem diferenças regionais de sinalização ao longo do tempo. Outra possibilidade para esse resultado pode estar relacionada ao fato de termos avaliado o HIP e o CPF totais. Pode haver modulações em sub-regiões específicas dessas estruturas cerebrais, conforme mostrado em outros estudos (RAME *et al.*, 2017; WANG; SHAO; WANG, 2018).

O presente estudo replicou alguns dos achados de estudos anteriores sobre os efeitos da fluoxetina (MONTEGGIA; BJ, 2016; NIBUYA; NESTLER; DUMAN, 1996; THOME *et al.*, 2000), mas promoveu descobertas adicionais importantes, que lançam uma nova luz sobre os mecanismos de sinalização subjacentes às respostas antidepressivas. Nosso estudo explorou, pela primeira vez, o conteúdo e a fosforilação de GluA4 após a administração crônica de fluoxetina e fornece evidências da modulação da subunidade GluA4 do AMPAR por este antidepressivo. Além disso, exploramos a modulação dos níveis de Narp após 21 dias de tratamento com fluoxetina no CPF e no HIP. Observamos que o conteúdo de Narp foi aumentado no HIP pela fluoxetina. Por outro lado, seu conteúdo foi diminuído no CPF acompanhando a redução expressiva do conteúdo de GluA4 nesta área. Em vista da diminuição significativa de GluA4 e seu papel como um receptor que pode ativar neurônios PV+ GABAérgicos no CPF (MAHESHWARI; NAHM; NOEBELS, 2013; PELKEY *et al.*, 2015), podemos supor que o tratamento crônico com fluoxetina pode diminuir o tônus GABAérgico levando a um aumento no tônus glutamatérgico nesta área do cérebro (**Fig. 22**).

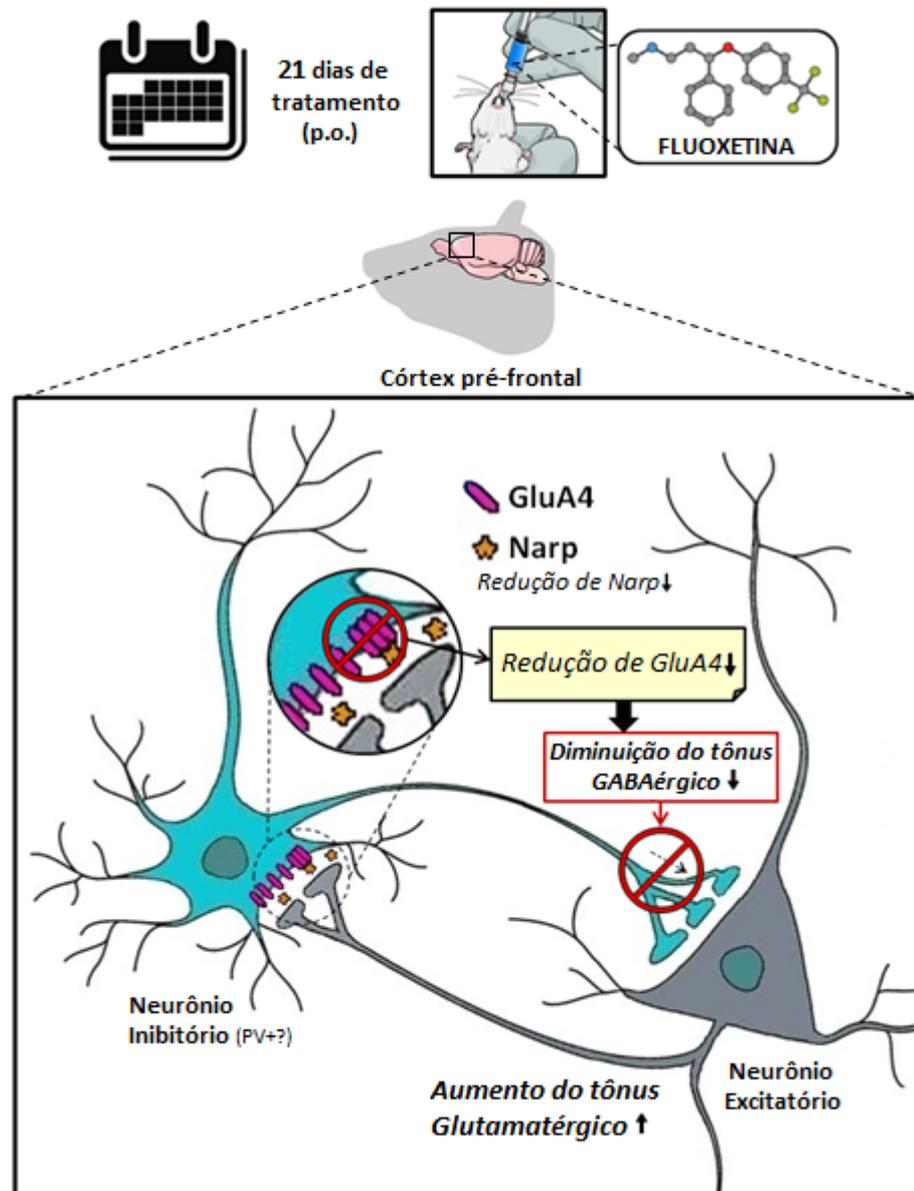


Fig. 22 Ilustração esquemática da modulação dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico após tratamento crônico com fluoxetina (21 dias). Nossos dados experimentais indicam que no córtex pré-frontal de camundongos há uma diminuição da subunidade AMPAR GluA4 e Narp após um tratamento crônico com fluoxetina por 21 dias. O mecanismo proposto é baseado em estudos anteriores que demonstram que, em condições de atividade neuronal, a pentraxina Narp é secretada por neurônios piramidais e agrupa o GluA4 pós-sináptico em sinapses excitatórias em interneurônios PV+ (Chang et al. 2010). Assim, hipotetizamos que a diminuição dos níveis de GluA4 em interneurônios PV+ reduz a atividade inibitória dos interneurônios que, por sua vez, diminui o tônus GABAérgico e, conseqüentemente, aumenta o tônus glutamatérgico no córtex pré-frontal.

O aumento da sinalização glutamatérgica no cérebro promove o influxo de cálcio pós-sináptico, mediado por receptores glutamatérgicos, que leva à liberação de BDNF por neurônios piramidais (LEPACK *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2014). O BDNF extracelular, por sua vez, ativa os receptores TrkB na membrana, resultando na estimulação de cascatas de sinalização intracelular, incluindo AKT, a enzima cinase do fator de alongamento eucariótico 2 (eEF2K) e o complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1), que em conjunto podem resultar em ações sinápticas que contribuem para respostas comportamentais antidepressivas (AUTRY *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2010).

## 2.8 CONCLUSÃO

Os resultados deste capítulo destacam a subunidade GluA4 do receptor AMPA e Narp como novos alvos que podem participar do mecanismo neuroquímico antidepressivo da fluoxetina. Pesquisas futuras serão necessárias para determinar a relação direta dessas proteínas com o tratamento antidepressivo. No entanto, nossos dados contribuem para ressaltar a importância da modulação de proteínas associadas aos sistemas GABAérgico e glutamatérgico além do sistema monoaminérgico. Notavelmente, o estudo destaca a importância de investigar a subunidade GluA4 do receptor AMPA, bem como a pentraxina Narp como possíveis alvos moleculares implicados no TDM e na resposta a antidepressivos.

### **3 CAPÍTULO II: GLUA4 E NARP NA FISIOPATOLOGIA DA EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL MESIAL COM ESCLEROSE HIPOCAMPAL (ELTM-EH)**

Neste capítulo, exploramos o papel modulatório da Narp e da subunidade GluA4 do receptor AMPA frente à fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal mesial com esclerose do hipocampo (ELTM-EH) em amostras de humanos e especialmente a resposta destas proteínas frente a administração aguda de dexametasona.

#### **3.1 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL (ELT)**

O termo "epilepsia" refere-se a um conjunto de doenças de diferentes etiologias, caracterizadas pela ocorrência espontânea e imprevisível de convulsões, ou seja, de sinais e/ou sintomas transitórios devido à atividade neuronal anormal excessiva e síncrona no cérebro (FISHER *et al.*, 2014). Estudos experimentais e clínicos sobre epilepsias genéticas e lesionais sugerem a existência de vários mecanismos patogénéticos comuns, que incluem alterações nas propriedades intrínsecas do neurônio e desequilíbrio entre sinais excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA) (BIALER; WHITE, 2010).

A epilepsia ocorre de forma imprevisível e afeta pessoas de todas as idades. Pode incluir convulsões generalizadas, que envolvem a atividade epileptiforme que emana de todo o córtex, bem como convulsões focais ou parciais, que resultam da atividade epileptiforme de uma única parte do córtex (HAUSER, 1992). Uma das formas mais comuns de epilepsia é a epilepsia do lobo temporal, frequentemente associada a cicatrizes gliais ou esclerose do hipocampo, onde as convulsões normalmente começam. Os mecanismos moleculares subjacentes ao início da crise induzem funções celulares prejudicadas.

A epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose do hipocampo (ELTM-EH) é caracterizada por crises recorrentes espontâneas, perda de células neuronais e gliose no hipocampo e amígdala (BANERJEE; FILIPPI; ALLEN HAUSER, 2009; WIESER, 2004). A ELTM-EH é a síndrome epiléptica mais comum passível de tratamento cirúrgico. Como a cirurgia envolve uma ressecção padronizada das estruturas neocortical e mesial do lobo temporal, ela oferece uma oportunidade ética de obtenção de amostras humanas, em condições bem controladas, para investigar o estado de fosforilação de proteínas.

### 3.2 ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS

Em modelos animais e pacientes com diferentes formas de epilepsia foram identificadas mutações genéticas ou alterações funcionais que levam à perda da função da neurotransmissão GABAérgica (alterações na síntese ou liberação de receptores GABA) ou ganho de função da neurotransmissão glutamatérgica (alterações nos receptores de glutamato ou recaptção) (BIALER; WHITE, 2010). Devido à função central dos AMPARs na neurotransmissão excitatória rápida, esses receptores podem desempenhar um papel proeminente no desenvolvimento e geração de convulsões (BRACEY *et al.*, 2009; MAAS *et al.*, 2006; PORTER; CUI; BROOKS-KAYAL, 2006).

A análise de tecidos cerebrais humanos *post-mortem* tem demonstrado redução da densidade e imunorreatividade de células PV+ em focos epilépticos no hipocampo e no neocórtex (ANDRIOLI *et al.*, 2007; FERRER *et al.*, 1994; SLOVITER *et al.*, 1991).

O córtex pré-frontal (CPF), a amígdala (AMG) e o hipocampo (HIP) são as principais estruturas cerebrais que medeiam estados de estresse e medo. O estresse pode ser útil ou prejudicial, dependendo de sua intensidade, duração e características pessoais. Os glicocorticóides (GCs) liberados durante as respostas ao estresse têm efeitos em todo o cérebro, com particular importância nas estruturas límbicas (CONRAD, 2008; GRAY *et al.*, 2017; ZALETEL; FILIPOVIĆ; PUŠKAŠ, 2016).

Em roedores, o estresse e a liberação excessiva de GC reduzem a plasticidade sináptica e as espinhas dendríticas no PFC e HIP, prejudicam a neurogênese hipocampal e aumentam a plasticidade sináptica e as alterações dendríticas na AMG, que têm sido associadas a anormalidades comportamentais. A sensibilidade do cérebro, particularmente o sistema límbico, aos GCs, como a dexametasona, pode contribuir para a alta incidência de efeitos colaterais neuropsiquiátricos relacionados aos GCs (CIRIACO *et al.*, 2013; DROZDOWICZ; BOSTWICK, 2014; KAZI; HOQUE, 2021; WARRINGTON; BOSTWICK, 2006).

### 3.3 OBJETIVO ESPECÍFICO

O objetivo aqui foi determinar, no córtex, amígdala e hipocampo, a distribuição das proteínas Narp, GluA4 e outras proteínas classicamente envolvidas em neuroplasticidade (CREB, BDNF, TrkB e calcineurina), bem como verificar a modulação dessas proteínas por

dexametasona nas amostras de pacientes humanos epiléticos que foram submetidos ao tratamento cirúrgico, por serem refratários aos tratamentos clínicos disponíveis.

## 3.4 MÉTODOS

### 3.4.1 Pacientes

O estudo inclui 36 pacientes adultos com ELTM-EH resistentes aos medicamentos, dos quais 28 foram tratados cirurgicamente entre maio de 2009 e dezembro de 2012 e 8 foram tratados cirurgicamente no ano de 2017 no Centro de Epilepsia do Estado de Santa Catarina (CEPESC). Esses pacientes participaram de um estudo prospectivo sobre marcadores de plasticidade sináptica em ELTM-EH. Todos eles tiveram convulsões que prejudicaram a consciência pelo menos uma vez por mês (média de 7,5 por mês), apesar do tratamento adequado, com pelo menos dois medicamentos antiepiléticos em monoterapia. Todos os pacientes tinham histórico médico completo, informações sobre a semiologia das crises, exames neurológicos, avaliação psiquiátrica e neuropsicológica, eletroencefalograma de superfície interictal e ictal e imagens de ressonância magnética consistentes com ELTM-EH unilateral.

### 3.4.2 Protocolo de anestesia

O protocolo anestésico utilizado, exceto o tratamento com dexametasona, foi o mesmo para todos os pacientes. A anestesia começou entre 7h30 e 8h30 com bolus intravenoso (i.v.) de propofol (2 mg/kg), fentanil (2 µg/kg) e rocurônio (0,9 mg/kg) seguido por remifentanil (0,1 a 0,2 µg/kg) e inalação de isofluorano (0,5 a 0,6 de concentração mínima alveolar). A hidratação foi feita com infusão contínua de solução salina isotônica a uma taxa de 1,2 ml/kg/hora (i.v.) mais metade do volume de diurese. A cefalotina (30 mg/kg) foi administrada 30 minutos antes do início da anestesia e repetida 4 horas mais tarde, depois da coleta das amostras de tecido cerebral. A analgesia foi complementada com morfina 0,1 mg/kg 30 min antes do final da cirurgia. As drogas antiepiléticas (DAEs) orais foram mantidas até o dia da cirurgia (dose às 6 h da manhã) e reintroduzidas logo após a recuperação do paciente da anestesia. Os pacientes que não faziam tratamento com fenitoína, receberam o fármaco (20 mg/kg, i.v.) 12 h antes da cirurgia e uma dose suplementar (5 mg/kg, i.v.) depois que as amostras de tecido cerebral foram

coletadas. Os pacientes que já faziam uso de fenitoína receberam apenas a respectiva dose oral matinal (às 6 h da manhã) e a dose adicional após a coleta das amostras de tecido cerebral.

### **3.4.3 Tratamento com dexametasona (DEXA)**

Estas análises foram feitas com as amostras dos 28 pacientes tratados cirurgicamente entre maio de 2009 e dezembro de 2012. Depois dos primeiros 10 pacientes serem submetidos ao processo cirúrgico, a equipe de anestesiologia decidiu modificar o protocolo de anestesia e passou a usar DEXA (10 mg, bolus i.v.) imediatamente após a intubação, como terapia adjuvante anti-inflamatória e antiemética para os 18 pacientes subsequentes. Com isso, temos dois grupos: pacientes que não receberam DEXA (n = 10) e pacientes que receberam DEXA (n = 18). A inclusão de DEXA no protocolo não foi baseada em nenhum dado clínico. A dose de DEXA foi calculada dividindo 10 mg pelo respectivo peso do paciente e administrada, portanto, em mg/kg para cada paciente. A dose média de DEXA foi de 0,1575 mg/kg. Embora este GC seletivo difira do cortisol endógeno em muitos aspectos de sua atividade transcricional, esta dose representa cerca de 27 vezes a secreção diária de cortisol em humanos adultos.

### **3.4.4 Cirurgia, variáveis transoperatórias e clínicas e amostragem do tecido cerebral**

As cirurgias e coleta de tecido - córtex (CTX), hipocampo (HIP) e amígdala (AMG) - foram realizadas pelo mesmo neurocirurgião, equipe médica e investigador principal conforme descrito anteriormente (Ronsoni et al., 2016). As amostras são oriundas do tecido cerebral removido durante um procedimento padrão de lobectomia anterior e temporal e, imediatamente após a coleta, foram congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram transferidas para um freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  onde ficaram armazenadas até as análises bioquímicas. A ressecção do lobo temporal lateral anterior incluiu os giros temporais médio e inferior estendidos até 4 cm posterior do pólo temporal. Antes da ressecção neocortical temporal, aproximadamente  $1\text{ cm}^2$  de amostra cortical localizada 3 cm posterior ao pólo temporal foi dissecada suavemente da substância branca através de um bisturi sem termocoagulação prévia. Após avaliação da região mesial temporal, dois terços da AMG foram coletados incluindo as regiões basal e lateral. Após a ressecção da AMG, o HIP foi removido e sua cabeça e parte do corpo foram rapidamente dissecadas em vidro refrigerado com gelo. Registrou-se, em cada

caso, o tempo de manipulação do HIP desde o início da eletrocoagulação até a sua ressecção completa. Os parâmetros hemodinâmicos e respiratórios (gasometria arterial, eletrólitos, hematócrito, hemoglobina, pressão arterial média, frequência cardíaca e respiratória), controlados durante a coleta de AMG e HIP, permaneceram estáveis durante todos os procedimentos. Não ocorreu nenhuma complicação transoperatória. O tempo decorrido desde o início da anestesia até a ressecção de cada amostra também foi controlado.

Há diversas variáveis clínicas além dos muitos dados demográficos, psiquiátricos, clínico-patológicos, cirúrgicos, eletrofisiológicos, de neuroimagem e moleculares coletados de pacientes submetidos à lobectomia temporal anterior-mesial para tratamento de epilepsia de difícil controle, no CEPESC e HU. As variáveis clínicas controladas incluíram sexo, raça, lado da esclerose hipocampal, idade, duração da doença (em anos), idade de início das crises convulsivas recorrentes, comorbidades psiquiátricas e qualidade de vida. Os medicamentos antiepilépticos utilizados foram carbamazepina (CBZ), fenobarbital (PNB), difenilhidantoina (DPH), ácido valpróico (VA), lamotrigina (LMT) ou topiramato (TPM), associados ou não a benzodiazepínicos (clobazam ou clonazepam).

O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (nº 365-FR304969), foi obtido o consentimento informado por escrito dos pacientes e todos os procedimentos foram realizados em conformidade com o Código de Ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsinki) para experimentos que envolvem seres humanos.

### **3.4.5 Análises neuroquímicas**

A análise bioquímica foi cega para todos os dados clínicos. As amostras foram colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o uso. Os procedimentos de *western blot* foram realizados conforme descrito anteriormente (Gonçalves et al., 2017).

#### *3.4.5.1 Preparação das amostras*

Todas as amostras de tecido cerebral (CTX, AMG e HIP) dos pacientes com ELT tratados cirurgicamente foram homogeneizadas pelo mesmo pesquisador (Lopes et al., 2016) com base no procedimento descrito por Oliveira et al. (2008). As amostras foram pesadas e homogeneizadas mecanicamente na proporção de 1/4 (p/v) em tampão com 100 mM de NaF,

50 mM de Tris (pH 7,0), 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM de EDTA, 0,1 mM de PMSF, 10% de glicerol e 1% de Triton X-100, além do coquetel inibidor de proteases *Amresco*<sup>®</sup> (concentração de trabalho 0,5 mM AEBSF, 0,3 µM de aprotinina, 50 µM de EDTA, 10 µM de bestatina, 10 µM de E-64, 10 µM de leupeptina). Posteriormente, os lisados foram centrifugados a 4° C (3.000g por 2 min e, na sequência, 10.000g por 10 min) para eliminação dos restos celulares. Os sobrenadantes foram diluídos 1/1 (v/v) com solução Tris 100 mM (pH 6,8), EDTA 4 mM e SDS 8% e rapidamente colocados em banho seco a 100 °C durante 5 min. Em seguida, o tampão (40% de glicerol, 100 mM de Tris e azul de bromofenol, pH 6,8) foi adicionado a uma razão de 25:100 (v/v) bem como o β-mercaptoetanol a uma concentração final de 8%.

Com o objetivo de minimizar os vieses entre os dias de preparação, que pudessem causar variação nos experimentos de *western blot* e levando em consideração que para estas amostras cerebrais de humanos não há grupo controle, foi criado uma amostra chamada de balizador (BLZ). O balizador foi feito com amostras de hipocampo de pacientes (*pool* de 3 amostras) seguindo o mesmo protocolo de preparação das demais amostras. O BLZ é um controle interno valioso. Esta amostra é aplicada em todas as eletroforeses realizadas e, portanto, nos permite fazer comparações e correlações entre as proteínas analisadas nas diversas estruturas cerebrais e em diferentes membranas de WB.

#### 3.4.5.2 *Dosagem de proteínas*

O conteúdo de proteína foi estimado pelo método de *Lowry* modificado descrito por Peterson (1977) usando albumina de soro bovino como padrão de proteína.

#### 3.4.5.3 *Eletroforese*

As amostras foram submetidas à eletroforese em mini géis de SDS-PAGE 10% ou 12% (eletroforese em gel de poliacrilamida 10% ou 12% contendo dodecil sulfato de sódio). Para este momento de separação das proteínas, a mesma quantidade de proteína (70 µg de proteína total por poço) de cada amostra foi aplicada com uma seringa Hamilton<sup>®</sup>.

#### 3.4.5.4 *Eletrotransferência*

Após a eletroforese, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência onde as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose usando um aparelho *semi-dry* (1,2 mA/cm<sup>2</sup>). Ao final, as membranas foram coradas com coloração de *Ponceau* 0,5% em ácido acético 1% para verificar a eficiência do processo de transferência.

#### 3.4.5.5 Imunodeteccção

As membranas foram incubadas em uma solução de bloqueio contendo 3% de albumina de soro bovino (BSA) em solução salina tamponada com Tris (TBS) (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) por 1 h em temperatura ambiente, e os alvos foram detectados após incubação *overnight* (4 °C) com anticorpos específicos diluídos em TBS com 1% Tween-20 (TBS-T) contendo 2% BSA. Os anticorpos primários produzidos em coelho utilizados no estudo foram: fosfo-CREB (*Cell Signaling*<sup>®</sup>, 1: 1000), total-CREB (*Cell Signaling*<sup>®</sup>, 1: 1000), BDNF (*Santa Cruz Biotechnology*<sup>®</sup>, 1: 1000), Narp (*Thermo Scientific*<sup>®</sup>, 1: 1000), fosfo-GluA4 (*Thermo Scientific*<sup>®</sup>, 1: 1000), total-GluA4 (*Thermo Scientific*<sup>®</sup>, 1: 1000), fosfo-TrkB (*Cell Signaling*<sup>®</sup>, 1: 1000), total-TrkB (*Cell Signaling*<sup>®</sup>, 1: 1000), Calcineurina (*Cell Signaling*<sup>®</sup>, 1: 2000) e o anticorpo primário produzido em camundongo utilizado foi:  $\beta$ -actina (*Santa Cruz Biotechnology*<sup>®</sup>, 1: 2500). No dia seguinte, as membranas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase correspondente anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo (Millipore<sup>®</sup> 1: 2500) para detectar proteínas por quimioluminescência intensificada.

Após as etapas de bloqueio e incubação, as membranas foram lavadas três vezes (5 min) com TBS-T. Para detectar as formas fosforiladas e totais na mesma membrana, os imunocomplexos foram removidos com uma solução de NaOH 0,2N, conforme descrito anteriormente (Freitas et al., 2014; Peres et al., 2013). As membranas sem imunocomplexos foram bloqueadas e seguiram as mesmas etapas descritas anteriormente. A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando o *software Image Lab*<sup>®</sup> 4.1 (*Bio-Rad Laboratories*). Os níveis de fosforilação foram determinados pela razão de DO das bandas fosforiladas sobre DO das bandas totais. Os imunocontéudos foram determinados pela razão de DO das bandas totais sobre a DO das bandas de  $\beta$ -actina. Os resultados estão expressos como valores relativos em comparação com o balizador (100%).

Quadro 2. Anticorpos utilizados no estudo com amostras de humanos.

<b>Anticorpo</b>	<b>Peso Molecular (proteína alvo)</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante (n° catálogo)</b>
<b>BDNF</b>	14 KDa	1:1000	Santa Cruz (SC546)
<b>β-Actina</b>	45 KDa	1:5000	Santa Cruz (SC47778)
<b>Calcineurina A PAN</b>	59 KDa	1:2000	Cell Signaling (2614S)
<b>CREB Total</b>	43 KDa	1:1000	Cell Signaling (9197S)
<b>CREB Phospho (Ser133)</b>	43 KDa	1:1000	Cell Signaling (9198S)
<b>GRIA4 Total</b>	100 KDa	1:1000	Thermo-Invitrogen (PA524217)
<b>GluR4 Phospho (Ser862)</b>	100 KDa	1:1000	Thermo-Invitrogen (PA536807)
<b>NPTX2</b>	47 KDa	1:1000	Thermo-Invitrogen (PA520521)
<b>TrkB Total</b>	140 KDa	1:1000	Cell Signaling (4603S)
<b>TrkB Phospho (Tyr706/707)</b>	140 KDa	1:1000	Cell Signaling (4621S)

### 3.4.6 Análise estatística

Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As comparações entre as amostras de CTX, AMG e HIP quanto à distribuição das proteínas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan. As comparações entre modulações neuroquímicas e variáveis dos pacientes frente ao tratamento com DEXA foram analisadas pelo teste t de Student. As variáveis independentes que mostraram uma distribuição não paramétrica pelo teste de Kolmogorov-Smirnov foram analisadas pelo Teste U Mann-Whitney. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. A análise estatística foi realizada no *Statistica*<sup>®</sup> (versão 7, *Software StatSoft*, Palo Alto, CA, EUA) e os gráficos foram construídos no *GraphPad Prism*<sup>®</sup> (versão 6, *GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA). As correlações com variáveis clínicas foram realizadas usando o *Statistica*<sup>®</sup> (versão 7, *Software StatSoft*, Palo Alto, CA, EUA) e o programa SPSS 17.

## 3.5 RESULTADOS

### 3.5.1 Modulações de GluA4, Narp e outras proteínas no córtex, amígdala e hipocampo de pacientes com ELTM-EH

Tendo em vista que animais nocaute para Narp apresentam evidente predisposição para apresentarem crises epilépticas (Chang et al., 2010) investigamos, inicialmente, o imunocontéudo dessa proteína nas amostras de HIP, AMG e CTX dos pacientes com epilepsia refratária com esclerose hipocampal mesial, submetidos à neurocirurgia.

Observamos que o conteúdo relativo (% do balizador) da proteína Narp é maior no HIP [ $F(2, 105) = 3,121, p < 0,01$ ], confirmado por análise *post-hoc*, que indicou uma diferença significativa da expressão dessa proteína no HIP ( $p < 0,01$ ) em relação ao CTX (Fig. 23).

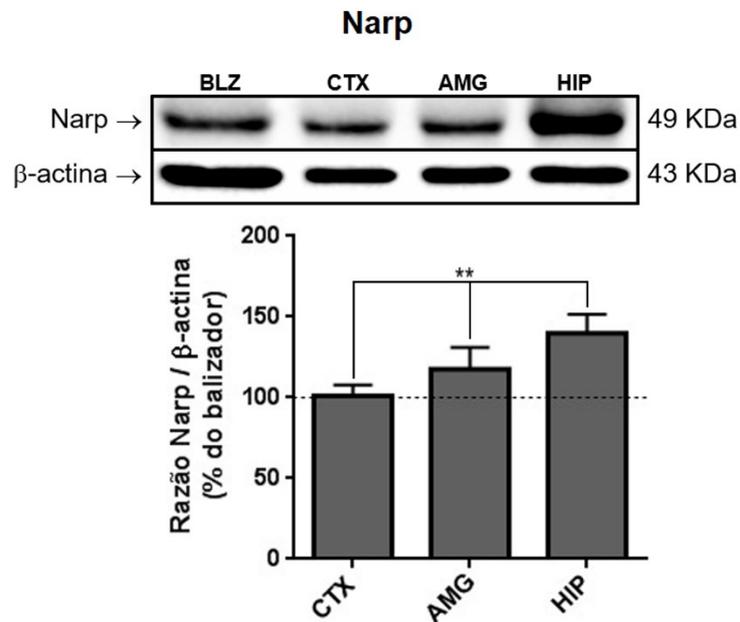


Fig. 23 Modulação de Narp em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. Western blot representativo do imunocontéudo de Narp e  $\beta$ -actina; e quantificação da expressão de Narp. Os resultados estão apresentados como porcentagem do balizador (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 36 pacientes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*\*  $p < 0,01$

Tendo em vista a relação com Narp, também analisamos o conteúdo e a fosforilação da subunidade GluA4 do AMPAR. Ao analisar o conteúdo total de GluA4 (total-GluA4/ $\beta$ -actina), foi observado uma diferença significativa no conteúdo relativo (% do balizador) da subunidade GluA4 [ $F(2, 105) = 25,11, p < 0,0001$ ], confirmado por análise *post-hoc*, que indicou uma expressão maior no CTX em relação às outras estruturas ( $p < 0,0001$ ) e maior na AMG em relação ao HIP ( $p < 0,05$ ) (Fig. 24b). Além disso, observou-se uma diferença significativa no nível de fosforilação da subunidade GluA4 Ser862 [ $F(2, 105) = 28,10, p$

<0,0001], confirmado por análise *post-hoc*, que indicou um maior nível de fosforilação do CTX ( $p < 0,0001$ ) com relação à AMG e o HIP (Fig. 24c). Também observamos que o nível de fosforilação na AMG é significativamente maior que no HIP ( $p < 0,01$ ). Ao analisar a taxa de fosforilação da subunidade Ser862 de GluA4 (fosfo-GluA4/total-GluA4), a ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa [ $F(2, 105) = 6,069, p < 0,01$ ]. A análise *post-hoc* indicou uma maior taxa de fosforilação no CTX ( $p < 0,001$ ) e na AMG ( $p < 0,01$ ) com relação ao HIP (Fig. 24a).

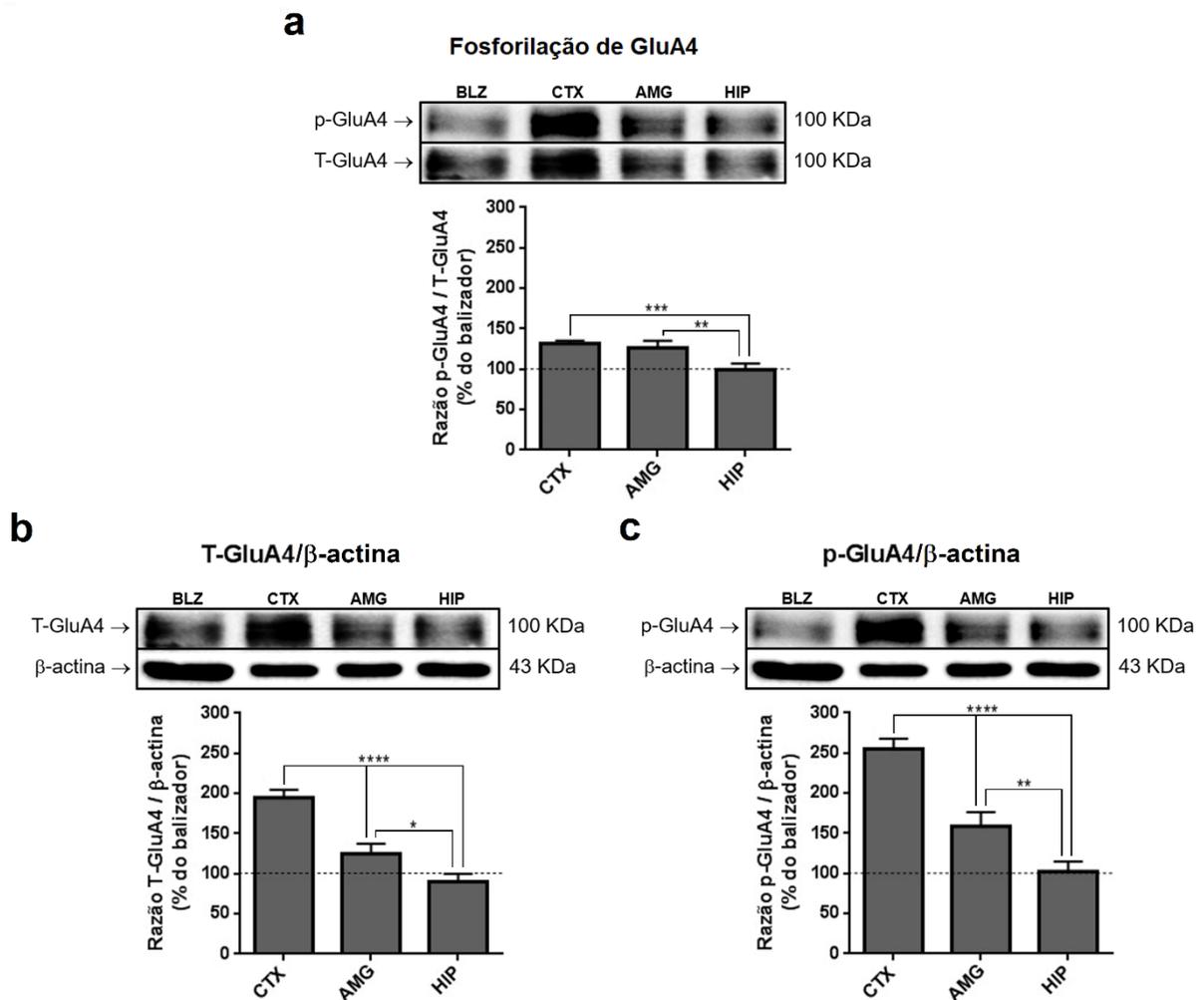


Fig. 24 Modulação de GluA4 em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. **(a)** Western blot representativo de fosfo-GluA4 (p-GluA4) e GluA4 total (T-GluA4); e quantificação da taxa de fosforilação de GluA4 (Ser862). **(b)** Western blot representativo de GluA4 total (T-GluA4) e  $\beta$ -actina; e quantificação da expressão de GluA4 em comparação com a  $\beta$ -actina. **(c)** Western blot representativo de fosfo-GluA4 (p-GluA4) e  $\beta$ -actina; e quantificação da fosforilação de GluA4 (Ser862), em comparação com a  $\beta$ -actina. Os resultados estão apresentados como

porcentagem do balizador (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 36 pacientes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Nesse contexto, verificamos também a modulação das proteínas CREB e BDNF. Observamos que o conteúdo relativo (% do balizador) da proteína BDNF é maior na AMG em relação ao HIP ( $p < 0,05$ ) (Fig. 25b). Também observamos uma tendência ( $p = 0,0539$ ) de o conteúdo relativo de BDNF ser maior na AMG em relação ao CTX. Em contrapartida, não observamos diferenças na taxa de fosforilação de CREB Ser133 entre as estruturas [ $F(2, 105) = 1,004$ ,  $p = 0,3699$ ] (Fig. 25a). Também não houve alteração do conteúdo total [ $F(2, 105) = 0,8904$ ,  $p = 0,4136$ ] e nível de fosforilação da proteína CREB [ $F(2, 105) = 1,746$ ,  $p = 0,1794$ ] entre nenhuma das estruturas analisadas (gráficos não mostrados).

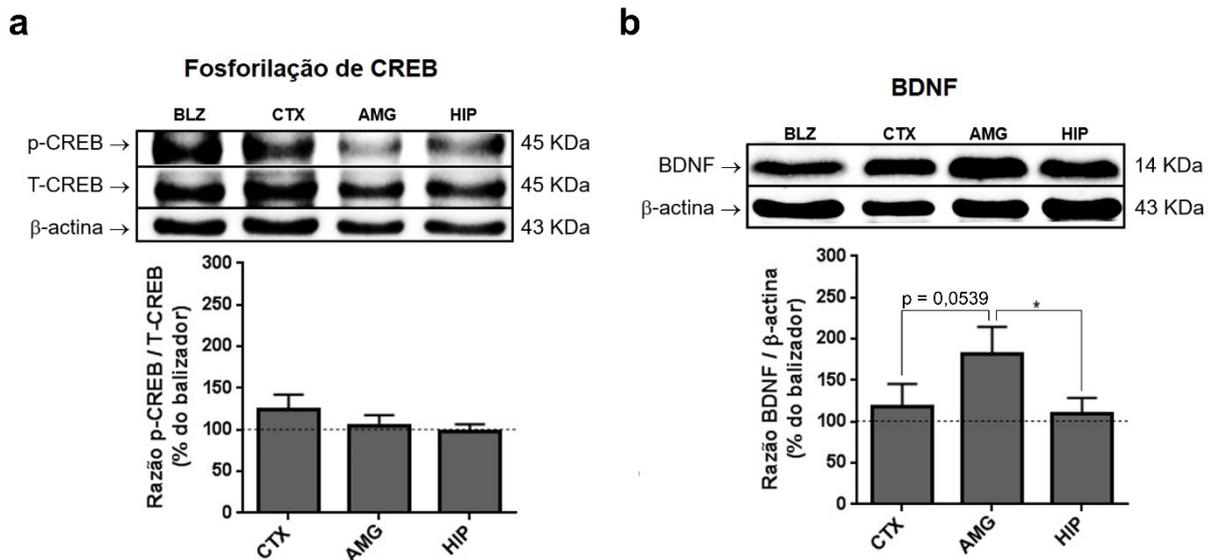


Fig. 25 . Modulação de CREB e BDNF em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. **(a)** Western blot representativo de fosfo-CREB (p-CREB), CREB total (T-CREB) e imunocntéudo de  $\beta$ -actina (controle de carga); e quantificação da taxa de fosforilação CREB (Ser133). **(b)** Western blot representativo do imunocntéudo de BDNF e de  $\beta$ -actina; e quantificação da expressão do BDNF. Os resultados estão apresentados como porcentagem do balizador (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 36 pacientes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*  $p < 0,05$

No próximo conjunto de experimentos, avaliamos a modulação de TrkB (Fig. 26) e observamos que o nível de fosforilação de TrkB em Tyr706/707 é bem maior no CTX ( $p <$

0,0001) em relação à AMG e HIP (Fig. 26c) e a taxa de fosforilação de TrkB (fosfo-TrkB/total-TrkB) encontra-se aumentada na AMG ( $p < 0,05$ ) em relação ao CTX e HIP (Fig. 26a). A ANOVA de uma via também revelou diferenças no conteúdo relativo (% do balizador) de TrkB [F (2, 105) = 26,02,  $p < 0,0001$ ] confirmado por análise *post-hoc*, que indicou maior expressão dessa proteína no CTX ( $p < 0,0001$ ) com relação à AMG e HIP (Fig. 26b).

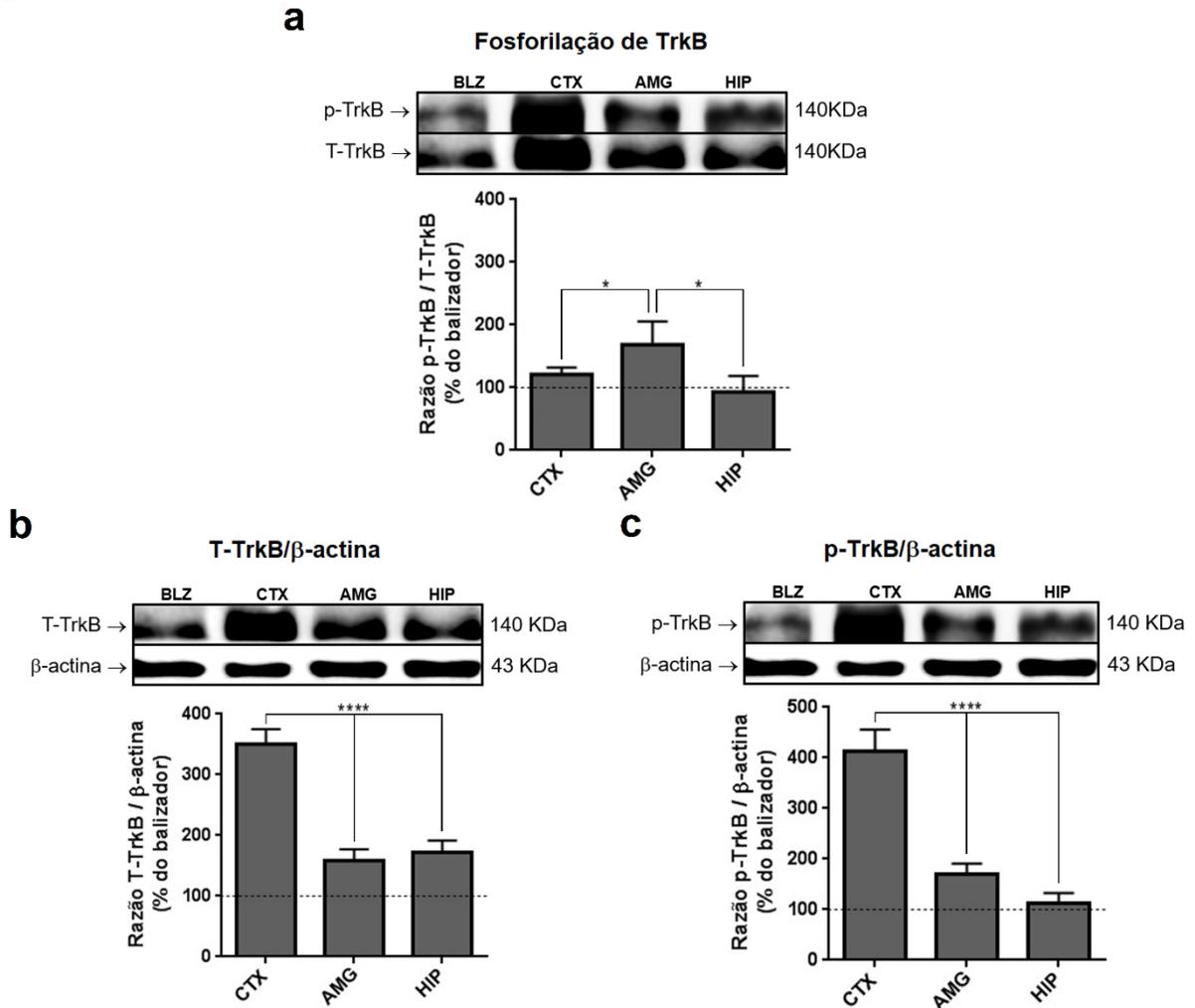


Fig. 26 Modulação de GluA4 em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. (a) Western blot representativo de fosfo-TrkB (p-TrkB) e TrkB total (T-TrkB); e quantificação da taxa de fosforilação de TrkB (Tyr706/707). (b) Western blot representativo de TrkB total (T-TrkB) e  $\beta$ -actina; e quantificação da expressão de TrkB em comparação com a  $\beta$ -actina. (c) Western blot representativo de fosfo-TrkB (p-TrkB) e  $\beta$ -actina; e quantificação da fosforilação de TrkB (Tyr706/707), em comparação com a  $\beta$ -actina. Os resultados estão apresentados como porcentagem do balizador (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 36

pacientes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Por fim, analisamos o imunoc conteúdo de Calcineurina e através da ANOVA de uma via percebemos que há diferenças no conteúdo relativo (% do balizador) dessa proteína [F (2, 105) = 2,044,  $p < 0,01$ ]. A análise *post-hoc* indicou uma maior expressão de Calcineurina no CTX ( $p < 0,001$ ) em relação à AMG (Fig. 27). Também observamos uma tendência ( $p = 0,0936$ ) de o conteúdo relativo de calcineurina ser maior no CTX em relação ao HIP.

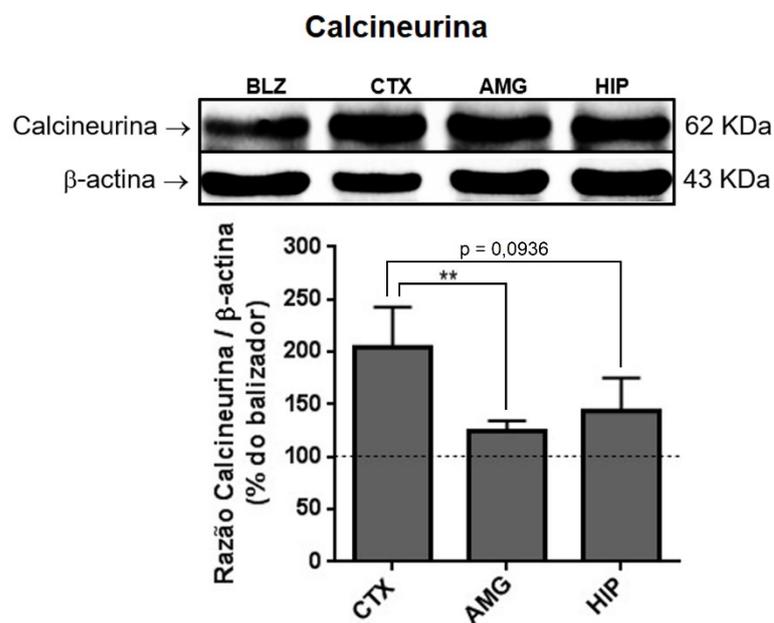


Fig. 27 Modulação de Calcineurina em amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) de pacientes com ELTM-EH. Western blot representativo do imunoc conteúdo de calcineurina e  $\beta$ -actina; e quantificação da expressão de Calcineurina. Os resultados estão apresentados como porcentagem do balizador (considerado 100%) e cada coluna e barra representam a média  $\pm$  EPM de 36 pacientes. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Duncan. \*\*  $p < 0,01$

Assim, a síntese de resultados que obtivemos com relação à expressão e fosforilação de proteínas nas amostras de pacientes com ELTM-EH está apresentada na figura 28.

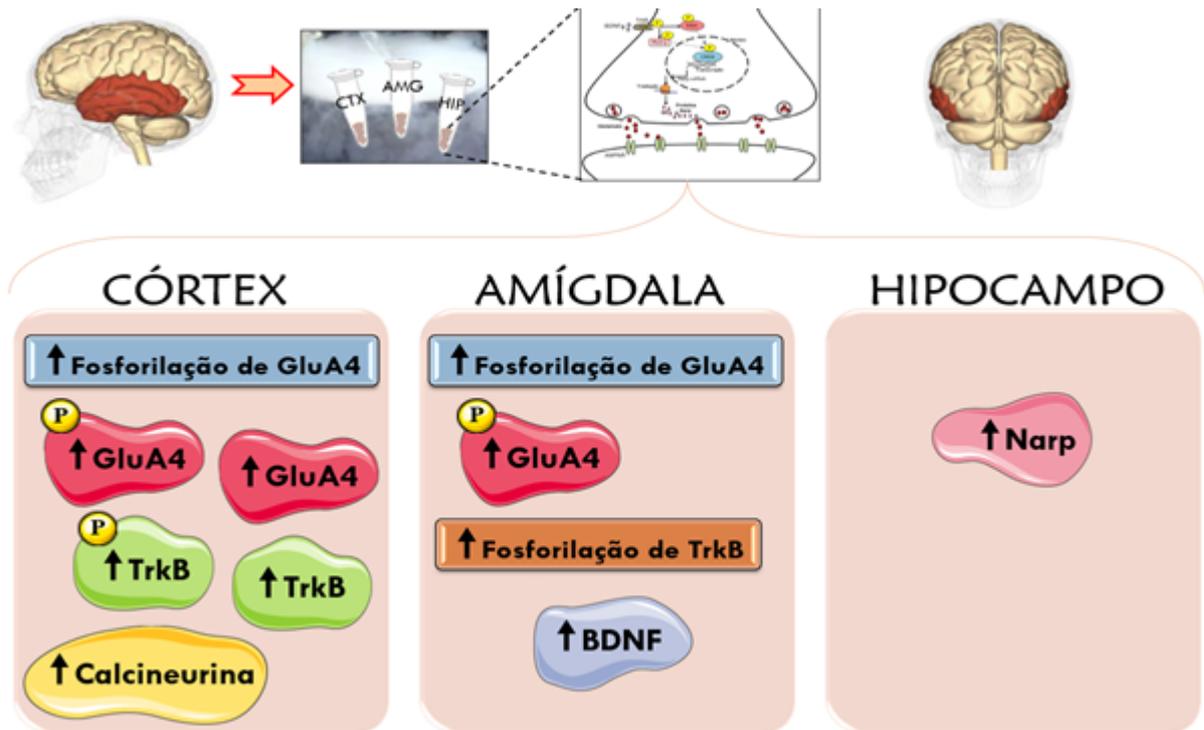


Fig. 28 Representação esquemática dos principais resultados. As amostras de córtex (CTX), amígdala (AMG) e hipocampo (HIP) foram coletadas e as análises bioquímicas realizadas posteriormente. Observamos que, no comparativo entre as estruturas cerebrais, o conteúdo relativo (% do balizador) de Narp é maior no HIP, BDNF é maior na AMG e GluA4 é mais proeminente no CTX. Já a taxa de fosforilação de GluA4 está mais proeminente no CTX e AMG. Além disso, há um conteúdo relativo maior de TrkB e Calcineurina no CTX. A taxa de fosforilação de TrkB encontra-se aumentada na AMG em comparação com as outras estruturas.

### 3.5.2 O efeito da administração de dexametasona na modulação de GluA4 e Narp

Considerando que os GCs têm efeitos em todo o cérebro, principalmente nas estruturas límbicas como CTX, AMG e HIP, também decidimos investigar a possível diferença entre os pacientes que receberam e os que não receberam tratamento com dexametasona na modulação das proteínas de interesse.

Os efeitos da administração de DEXA sobre os alvos GluA4, Narp e CREB no CTX, AMG e HIP de pacientes com ELTM-EH são apresentados na tabela 1. A análise estatística indicou aumento na fosforilação de GluA4 e na expressão de Narp no hipocampo de pacientes que receberam dexametasona. Além disso, também foram observadas modulações no CREB. Apesar de haver um aumento no imunocontéudo de CREB (Total-CREB), observamos uma

diminuição significativa na taxa de fosforilação dessa proteína no hipocampo de pacientes que receberam dexametasona. No córtex e amígdala não foram encontradas alterações.

Tabela 1 Modulação das proteínas no córtex, amígdala e hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial tratados cirurgicamente que receberam ou não tratamento com dexametasona (DEXA).

Variáveis	Todos os casos n = 28	Não receberam	Receberam	Valor de p
		DEXA n = 10	DEXA n = 18	
<b>CÓRTEX</b>				
P-GluA4	129.3 (3.9)	127.2 (6.5)	130.5 (5.0)	0.83 <sup>a</sup>
Narp	95.8 (7.0)	82.9 (8.8)	103.0 (9.5)	0.17
P-CREB	109.2 (19.4)	84.2 (30.9)	123.1 (24.9)	0.27 <sup>a</sup>
<b>AMÍGDALA</b>				
P-GluA4	130.5 (10.4)	142.8 (22.6)	123.7 (10.5)	0.80 <sup>a</sup>
Narp	109.2 (14.6)	87.4 (17.1)	121.4 (20.5)	0.31 <sup>a</sup>
P-CREB	86.0 (9.4)	79.0 (16.6)	89.8 (11.6)	0.58
<b>HIPOCAMPO</b>				
P-GluA4	94.3 (9.2)	63.0 (14.9)	111.7 (9.8)	<b>0.03</b> <sup>a</sup>
Narp	137.0 (12.9)	101.8 (19.0)	156.6 (15.6)	<b>0.04</b>
P-CREB	90.1 (9.7)	117.3 (20.6)	75.0 (8.5)	<b>0.03</b>
Total-GluA4	89.5 (12.0)	82.1 (22.2)	93.6 (14.4)	0.87 <sup>a</sup>
Total-CREB	75.9 (18.2)	39.3 (15.7)	96.3 (26.0)	<b>0.02</b> <sup>a</sup>
GFAP	105.0 (1.4)	102.7 (1.8)	106.3 (1.9)	0.23

Os valores são apresentados como média  $\pm$  EPM de 28 pacientes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. \*  $p < 0,05$ . <sup>a</sup> Variáveis independentes que mostraram uma distribuição não paramétrica pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e foram analisadas pelo Teste U Mann-Whitney.

Diante das modulações observadas, decidimos analisar se esses resultados estariam associados com variáveis clínicas, cirúrgicas, demográficas, neurorradiológicas, neurofisiológicas dos pacientes (tabela 2). A correlação entre essas variáveis indicou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os pacientes que receberam ou não tratamento com DEXA para

os seguintes pontos: Regime de Drogas Antiepilépticas (DAEs), Frequência mensal de convulsões e Glicose. Além disso, há uma tendência de diferença para as variáveis  $\text{HCO}_3$  ( $p = 0,06$ ) e Sódio ( $p = 0,09$ ). As variáveis sexo ( $p = 0,10$ ), esclerose hipocampal ( $p = 0,11$ ) e ácido láctico ( $p = 0,11$ ) também chamaram a atenção e exigem análises mais detalhadas.

Outra variável importante que apresentou uma tendência de diferença entre as amostras foi o tempo de armazenamento das amostras (meses). Os resultados mostram que as amostras dos pacientes que não receberam DEXA ficaram armazenadas por mais tempo do que as dos pacientes que receberam DEXA.

Tabela 2 Variáveis clínicas, cirúrgicas, demográficas, neurorradiológicas, neurofisiológicas de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial tratados cirurgicamente que receberam ou não tratamento com dexametasona (DEXA).

<b>Variáveis</b>	<b>Todos os casos</b> n = 28	<b>Não receberam DEXA</b> n = 10	<b>Receberam DEXA</b> n = 18	<b>Valor de p</b>
<b>Sexo</b>				
Feminino	18 (64.3)	04 (40.0)	14 (77.8)	
Masculino	10 (35.7)	06 (60.0)	04 (22.2)	<b>0.10</b>
<b>Raça</b>				
Caucasiana	24 (85.7)	09 (90.0)	15 (83.3)	
Outros	04 (14.3)	01 (10.0)	03 (16.7)	1.0
<b>Estado civil</b>				
Solteiro	15 (53.6)	07 (70.0)	08 (44.4)	
Casado	09 (32.1)	02 (20.0)	07 (38.9)	
Divorciado ou Viúvo	4 (14.3)	01 (10.0)	03 (16.7)	0.43
<b>Atividade de trabalho atual</b>				
Trabalhando	09 (32.1)	04 (40.0)	05 (27.8)	
Do lar	06 (21.4)	01 (10.0)	05 (27.8)	
Seguro de saúde	07 (25.0)	01 (10.0)	06 (33.3)	
Não está trabalhando	06 (21.24)	04 (40.0)	02 (11.1)	0.16

**Histórico de IPI**

Não	06 (21.4)	03 (20.0)	04 (22.2)	
Sim	22 (78.6)	08 (80.0)	14 (77.8)	0.89

**Esclerose hipocampal**

Lado direito	13 (46.4)	03 (30.0)	11 (61.1)	
Lado esquerdo	15 (53.6)	07 (40.0)	07 (38.9)	<b>0.11</b>

**Regime de DAEs**

Monoterapia	9 (32.1)	06 (60.0)	03 (16.7)	
Duas ou mais drogas	19 (67.9)	04 (40.0)	15 (83.3)	<b>0.03</b>

**Benzodiazepínicos**

Sim	13 (46.4)	06 (60.0)	07 (38.9)	
Não	15 (53.6)	04 (40.0)	11 (63.1)	0.43

**Drogas antiepiléticas**

## Carbamazepina

Não	05 (17.9)	03 (30.0)	02 (11.1)	
Sim	23 (82.1)	07 (70.0)	16 (88.9)	0.31

## Fenobarbital

Não	18 (64.3)	08 (80.0)	10 (55.6)	
Sim	10 (35.7)	02 (20.0)	08 (44.4)	0.25

## Difenilhidantoína

Não	25 (89.3)	10 (10.0)	15 (83.3)	
Sim	03 (10.7)	0	02 (16.7)	0.53

## Ácido valpróico

Não	25 (89.3)	09 (90.0)	16 (88.9)	
Sim	03 (10.7)	01 (10.0)	02 (11.1)	1.0

## Lamotrigina

Não	24 (85.7)	08 (80.0)	16 (88.9)	
Sim	04 (14.3)	02 (20.0)	02 (11.1)	0.60

## Topiramato

Não	26 (92.9)	10 (100.0)	16 (88.9)	
Sim	02 (7.1)	0	02 (11.1)	0.52

**Dominância manual**

Destro	26 (92.9)	09 (90.0)	17 (94.4)	
Canhoto	02 (7.1)	01 (10.0)	01 (5.6)	1.0

**Comorbidades psiquiátricas**

Sem diagnóstico	14 (50.0)	04 (40.0)	10 (55.6)	
Desordem depressiva	8 (28.6)	02 (20.0)	06 (33.3)	
Transtorno de ansiedade	02 (7.1)	01 (10.0)	01 (5.6)	
Outras condições psiquiátricas <sup>a</sup>	04 (14.3)	03 (30.0)	01 (5.6)	0.31

---

Média (E.P.M.)

---

<b>Idade (anos)</b>	36.9 (2.1)	33.4 (3.6)	38.8 (2.6)	0.24
<b>Educação (anos)</b>	6.7 (0.6)	6.0 (1.1)	7.1 (0.7)	0.40
<b>Duração da doença (anos)</b>	24.4 (1.9)	23.7 (0.9)	24.8 (2.6)	0.79
<b>Frequência mensal de convulsões</b>	9.6 (1.7)	4.2 (0.9)	12.6 (2.4)	<b>0.02</b>
<b>QOLIE-31</b>	33.2 (2.9)	35.6 (4.4)	31.8 (3.9)	0.55
<b>Parâmetros intraoperacionais</b>				
Pressão arterial média	68.3 (1.8)	66.2 (3.0)	69.3 (2.3)	0.45
Frequência cardíaca	73.8 (2.4)	70.3 (4.1)	75.6 (2.9)	0.30
Frequência respiratória	11.6 (0.3)	11.7 (0.5)	11.5 (0.4)	0.75 <sup>g</sup>
<b>Análise bioquímica do sangue</b>				
pH	7.42 (0.01)	7.42 (0.01)	7.42 (0.01)	0.97
PCO <sub>2</sub>	28.3 (0.8)	29.3 (1.6)	27.8 (1.0)	0.55 <sup>g</sup>

HCO <sub>3</sub>	20.2 (0.3)	21.1 (0.6)	19.6 (0.4)	<b>0.06</b>
PO <sub>2</sub>	227.2 (12.0)	207.0 (26.4)	238.4 (11.5)	0.52 <sup>g</sup>
Saturação de O <sub>2</sub>	99.7 (0.0)	99.7 (0.0)	99.7 (0.0)	0.72 <sup>g</sup>
Hematócrito	35.0 (0.7)	34.5 (1.3)	35.2 (0.8)	0.71 <sup>g</sup>
Hemoglobina	11.6 (0.2)	11.5 (0.4)	11.6 (0.3)	0.93 <sup>g</sup>
Glicose	116.4 (5.5)	98.0 (4.0)	123.2 (6.6)	<b>0.01</b>
Sódio	137.9 (0.6)	136.1 (1.4)	138.6 (0.7)	<b>0.09</b>
Potássio	4.1 (0.1)	4.2 (0.1)	4.0 (0.0)	0.47
Cálcio iônico	4.2 (0.2)	4.3 (0.1)	4.2 (0.2)	0.59
Magnésio	0.4 (0.01)	0.4 (0.02)	0.4 (0.0)	0.22
Ácido láctico	2.0 (0.2)	1.5 (0.2)	2.2 (0.3)	<b>0.11</b>
Tempo de armazenamento das amostras (meses) <sup>b</sup>	23.4 (1.7)	27.7 (3.2)	20.1 (1.8)	<b>0.09</b>
Tempo desde a última convulsão (horas) <sup>c</sup>	171 (38.4)	233.7 (76.2)	143.7 (43.9)	0.29 <sup>g</sup>
Tempo para retirada do CTX (min) <sup>d</sup>	191.1 (7.7)	185.1 (11.4)	194.7 (10.4)	0.56
Tempo para retirada da AMG/HIP (min) <sup>e</sup>	264.2 (10.9)	256.0 (18.8)	268.5 (13.7)	0.59
Tempo de manipulação do HIP (min) <sup>f</sup>	11.6 (1.0)	11.9 (1.5)	11.5 (1.3)	0.88

<sup>a</sup> Outras condições psiquiátricas: transtorno disfórico de epilepsia, psicose pós-ictal, ansiedade pós-ictal; <sup>b</sup> Tempo de armazenamento entre a coleta das amostras e a análise neuroquímica (faixa de 8 a 39 meses). <sup>c</sup> Curso de tempo desde a última ocorrência de ataque convulsivo e amostragem de tecido cerebral (intervalo de 12 a 590 horas). <sup>d</sup> Curso de

tempo desde a indução da anestesia até a retirada de tecido do CTX (faixa de 119 a 255 min). <sup>e</sup> Curso de tempo desde a indução da anestesia até a retirada de tecido da AMG/HIP (faixa de 160 a 360 min). <sup>f</sup> Curso de tempo desde que começou a termocoagulação dos vasos do HIP até a ressecção completa do HIP (faixa de 5 a 25 min). <sup>g</sup> Variáveis independentes que mostraram uma distribuição não paramétrica pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e foram analisadas pelo Teste U Mann-Whitney. As demais variáveis que apresentaram distribuição paramétrica foram analisadas pelo teste t de Student. Abreviaturas: IPI, insulto precipitante inicial; DAES, drogas antiepilépticas; QOLIE-31, sigla em inglês “Quality of Life in Epilepsy Inventory-31” que significa Inventário de qualidade de vida em epilepsia. CTX, neocórtex temporal médio; AMG, amígdala; HIP, hipocampo.

### 3.6 DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados são de pacientes com síndrome epilética que promove alterações estruturais e funcionais da neuroplasticidade incluindo perda variável de neurônios e gliose nas estruturas analisadas (ARAÚJO *et al.*, 2006). Essas alterações estruturais e funcionais implicam numa série de modificações neuroquímicas complexas.

Em primeiro lugar, demonstramos que o conteúdo relativo de Narp é maior no HIP do que no CTX e AMG dos pacientes com ELTM-EH. Esse resultado está de acordo com um estudo feito por Reti e Baraban (2000), por exemplo, que demonstra um aumento sustentado na expressão de Narp no hipocampo após uma série de crises eletroconvulsivas (ECS) (RETI; BARABAN, 2000).

Sabemos que o sistema nervoso tem a capacidade de modular a transmissão sináptica em resposta à padrões espaciais e temporais específicos de disparo neuronal, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas. Um mediador desses processos adaptativos neuronais é o BDNF, cuja expressão e liberação são reguladas pela atividade neuronal (GROTH; MERMELSTEIN, 2003; ZAFRA *et al.*, 1990). Aqui, observamos que o conteúdo relativo de BDNF é maior na AMG do que no CTX e HIP dos pacientes com ELTM-EH.

Em amostras de indivíduos com epilepsia refratária, foram observadas diminuições significativas na expressão do RNAm da subunidade do receptor GluA1 e GluA4 no hipocampo e tecido cortical temporal (GRIGORENKO *et al.*, 1997). O RNAm para a subunidade GluA4 diminuiu cerca de 68% no hipocampo, mas em contraste com o GluA1, o nível de RNAm de GluA4 não diminuiu no córtex temporal. Aqui estudamos a subunidade GluA4 do AMPAR e observamos que seu conteúdo relativo é mais proeminente no CTX. Já a taxa de fosforilação de GluA4 está mais proeminente no CTX e AMG.

A via BDNF/TrkB pode afetar ou participar da epileptogênese, pois já foi demonstrado que a expressão da proteína de TrkB e o valor de densidade óptica média (DO) de células positivas para GFAP e TrkB no córtex temporal e hipocampo aumentaram significativamente após o início da epilepsia (LIU *et al.*, 2016). Em nossas análises encontramos um conteúdo relativo maior de TrkB no CTX em comparação com a AMG e HIP. Com relação à taxa de fosforilação de TrkB, observamos que se encontra aumentada na AMG em comparação com as outras estruturas.

Além das proteínas intracelulares e transmembrana que se associam com AMPARs para regular seu posicionamento dentro de uma sinapse e suas propriedades biofísicas, há uma série de interações proteína-proteína transsinápticas que aumentam ainda mais essa complexidade. Isso demonstra que os AMPARs estão no centro de um complexo de proteínas que é altamente dinâmico e que exhibe um alto grau de variabilidade na dependência do tipo celular e da estrutura sináptica.

O córtex pré-frontal medial exerce controle sobre outras regiões do cérebro que regulam a emoção e o humor (RIGA *et al.*, 2014), mais notavelmente a amígdala, e a perda de conexões sinápticas do PFC para esta e outras regiões do cérebro pode promover déficits cognitivos. O hipocampo, por sua vez, é uma estrutura límbica com altos níveis de receptores de glicocorticóides que fornecem *feedback* negativo para o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (CHAN *et al.*, 2016). Assim, após avaliarmos a distribuição de proteínas no CTX, AMG e HIP, também verificamos o efeito de uma única dose alta de DEXA, nos níveis de fosforilação e expressão de proteínas nestas estruturas. Obtivemos resultados interessantes acerca da modulação de GluA4, Narp e CREB. Diante da administração de DEXA, houve um aumento significativo na fosforilação da subunidade GluA4 no HIP dos pacientes tratados cirurgicamente. O conteúdo total de GluA4 (Total-GluA4) não foi alterado. Além disso, também observamos aumento da proteína Narp e diminuição da fosforilação de CREB no hipocampo de pacientes que receberam DEXA.

Um estudo anterior do nosso grupo iniciou a discussão acerca dos efeitos dos glicocorticóides (GCs) em biomarcadores de neuroplasticidade sináptica no sistema límbico humano (LOPES *et al.*, 2016a). Foi demonstrado que 4 h após uma alta dose de DEXA, os níveis de p-GluA1-Ser831, mas não de p-GluA1-Ser845, e os níveis de CaMKII fosforilada diminuem significativamente na AMG de pacientes com ELTM-EH. Esses resultados indicam que o tratamento com DEXA altera o resíduo de serina 831 do GluA1-AMPAR para um estado defosforilado (LOPES *et al.*, 2016a).

Um estudo de estresse agudo apresentou aumento da indução de LTP no hipocampo devido ao tráfego de AMPAR modulado pela exposição à dexametasona ou corticosterona (Whitehead et. al, 2013). Da mesma forma, Wang e colaboradores (2019) mostraram que dexametasona aumentou a fosforilação e a expressão de superfície de AMPARs contendo GluA1 e aumentou a LTP nas regiões CA1 de camundongos. Portanto, as evidências mostram que os GCs modulam a transmissão das sinapses glutamatérgicas aumentando a inserção sináptica de AMPARs (DE QUERVAIN; SCHWABE; ROOZENDAAL, 2016; MIKASOVA *et al.*, 2017). Funcionalmente, esse processo contribui diretamente para a indução da potenciação sináptica. Tendo em vista que observamos aumento na fosforilação da subunidade GluA4 do AMPAR nas amostras de hipocampo dos pacientes que receberam DEXA, podemos supor que isso contribua para inserção sináptica desses receptores.

Nossos resultados também indicaram um aumento no conteúdo de Narp no hipocampo em resposta ao tratamento agudo com DEXA. Deve ser ressaltado que existem muito poucos estudos correlacionando Narp e a ação de glicocorticóides. Entretanto um estudo recente indicou que Narp no hipocampo poderia desempenhar um papel crítico na modulação da ansiedade, proliferação de células do hipocampo e expressão gênica relacionada ao receptor de glicocorticóide. Nesse sentido foi demonstrado que camundongos nocaute para Narp no hipocampo, mas não na amígdala, apresentavam níveis mais elevados de ansiedade, bem como aumento da expressão de genes alvo do receptor de glicocorticóide (CHANG *et al.*, 2018). Dessa forma, baseado nos nossos resultados e nas evidências previamente descritas pode se sugerir uma conexão funcional entre Narp e resposta a glicocorticóides. Entretanto, fica evidente a necessidade de estudos adicionais para estabelecer os possíveis mecanismos de sinalização associados à ativação de receptores glicocorticóides e expressão de Narp. Nesse sentido, um primeiro passo seria utilizar modelos animais para avaliar essa regulação de forma mais profunda e utilizando ferramentas farmacológicas.

Na tabela 2, também observamos que há uma tendência de diferença entre as amostras quanto ao tempo de armazenamento (meses): as amostras dos pacientes que não receberam DEXA permaneceram armazenadas por mais tempo do que as amostras dos pacientes que receberam DEXA. Os 10 primeiros pacientes submetidos à cirurgia não receberam DEXA e após modificação do protocolo de anestesia por parte da equipe de anestesiologia, os próximos 18 pacientes receberam DEXA após a intubação. Isso significa que as amostras dos pacientes que não receberam DEXA foram coletadas antes dos pacientes que receberam DEXA e, por isso, apresentam um tempo maior de armazenamento. Assim, uma abordagem translacional,

utilizando modelos animais, será importante para comprovar estas evidências apresentadas em humanos.

A inclusão de diferentes momentos do tratamento com DEXA não é clinicamente viável, considerando que os pacientes recebem o tratamento com DEXA na indução da anestesia e a coleta de tecido depende do próprio tempo da cirurgia. Embora os possíveis desequilíbrios de mudanças estruturais entre os grupos investigados tenham sido controlados e a coleta de dados feita de forma prospectiva, sob cuidados exaustivos sobre as variáveis de confusão seguindo um protocolo de pesquisa pré-determinado aprovado, não podemos excluir que os efeitos observados de DEXA podem estar, pelo menos em algum grau, relacionados ao histórico de epilepsia e às variáveis patológicas, clínicas e farmacológicas relacionadas e que não ocorrem em pessoas sem epilepsia.

Assim, reconhecemos as principais limitações dessa parte da pesquisa: 1) o tamanho limitado da amostra pode ter gerado falsos negativos e impossibilitado correlações mais altas entre os dados bioquímicos e as variáveis dos pacientes; 2) os resultados não podem ser extrapolados para pacientes com epilepsias diferentes da síndrome ELTM-EH; 3) embora todos os esforços tenham sido realizados para controlar as variáveis clínicas, operatórias e procedimentais, eventuais flutuações podem ocorrer e não serem percebidas nas avaliações.

Considerando estes aspectos, análises estatísticas multivariadas subsequentes serão necessárias para excluir o viés de confusão relacionado à distribuição assimétrica das variáveis nos dois grupos (pacientes que não receberam DEXA *versus* pacientes que receberam DEXA). Ademais, será necessário investigar a correlação entre as variáveis e os níveis de proteínas e fosforilação para que possamos inferir, com maior segurança, associações entre o tratamento com dexametasona e as modulações das proteínas nas estruturas analisadas.

Por fim, também devemos aprofundar as análises relativas à depressão e ansiedade. A sensibilidade do cérebro aos GCs, particularmente o sistema límbico, pode contribuir para a alta incidência de efeitos colaterais neuropsiquiátricos relacionados aos GCs. Os estudos dessas anormalidades comportamentais, também deve ser considerado em análises futuras. Em especial, associações relacionadas a depressão e ansiedade, por exemplo.

### 3.7 CONCLUSÃO

Os resultados deste capítulo sugerem possíveis alvos neuroquímicos que podem ser abordados para tentar compreender a fisiopatologia molecular da epilepsia. Foi possível

determinar de maneira inédita os conteúdos relativos de Narp e GluA4 entre amostras de córtex, amígdala e hipocampo de pacientes com epilepsia refratária com esclerose hipocampal mesial submetidos à cirurgia.

Também demonstramos possíveis efeitos de um GC em marcadores-chave da neuroplasticidade sináptica no sistema límbico humano. O possível papel da Narp e modulação de AMPA (GluA4) na fisiopatologia da ELTM-EH tem sido indicada na literatura, especialmente em modelos animais. Assim, a abordagem inicial feita em nosso estudo pode abrir caminho para traçar novas estratégias de investigação destes alvos em humanos e tentar associar com alterações psiquiátricas, tratamento e/ou mesmo prognóstico. Adicionalmente, a indicação de que GC podem modular essas proteínas de transdução de sinal envolvidas na plasticidade sináptica no sistema límbico contribuem para um melhor entendimento dos efeitos de corticosteroides no encéfalo humano em condições fisiopatológicas e farmacológicas.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação e caracterização da modulação de moléculas que regulam a agregação de receptores de neurotransmissores nas sinapses é central para a compreensão da fisiopatologia de diversas neuropatologias. Nesse sentido, apresentamos bases moleculares para conhecimento da neuroplasticidade e indicamos a possibilidade de novos alvos terapêuticos para tratamento de transtornos depressivos e da necessidade de maior investigação em relação ao envolvimento destas proteínas na epilepsia e em tratamentos clínicos com corticosteroides e situações de estresse onde os GC desempenhem papel preponderante.

Portanto, as modulações de Narp e da subunidade GluA4 do receptor AMPA, intimamente implicados na plasticidade sináptica, as tornam alvos potenciais na mediação dos efeitos de longo prazo em resposta a tratamentos psiquiátricos.

## REFERÊNCIAS

AKANA, S. F. *et al.* Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotrophic hormone, insulin and fat depots. **Journal of Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 625–637, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00676.x>

ALME, Maria Nordheim *et al.* Chronic Fluoxetine Treatment Induces Brain Region-Specific Upregulation of Genes Associated with BDNF-Induced Long-Term Potentiation. **Neural Plasticity**, [S. l.], v. 2007, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2007/26496>

ANDREWS, Paul W. *et al.* Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 51, p. 164–188, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.018>

ANDRIOLI, A. *et al.* Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. **Neuroscience**, [S. l.], v. 149, n. 1, p. 131–143, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.029>

ARAÚJO, David *et al.* Volumetric evidence of bilateral damage in unilateral mesial temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, [S. l.], v. 47, n. 8, p. 1354–1359, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2006.00605.x>

ATANASOVA, Tsvetomira; KHARYBINA, Zoya; KAARELA, Tiina. GluA4 Dependent Plasticity Mechanisms Contribute to Developmental Synchronization of the CA3 – CA1 Circuitry in the Hippocampus. **Neurochemical Research**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 562–571, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2392-8>

ATHIRA, Kaipuzha Venu *et al.* An Overview of the Heterogeneity of Major Depressive Disorder: Current Knowledge and Future Prospective. **Current Neuropharmacology**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 168–187, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159x17666191001142934>. Acesso em: 11 jun. 2021.

AUTRY, Anita E. *et al.* NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**, [S. l.], v. 475, n. 7354, p. 91–95, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature10130>

BABIEC, Walter E.; GUGLIETTA, Ryan; O'DELL, Thomas J. Basal levels of AMPA receptor GluA1 subunit phosphorylation at threonine 840 and serine 845 in hippocampal neurons. **Learning and Memory**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 127–133, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/lm.040675.115>

BANERJEE, Poonam Nina; FILIPPI, David; ALLEN HAUSER, W. The descriptive epidemiology of epilepsy-A review. **Epilepsy Research**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 31–45, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2009.03.003>

BARAUNA, Sara C. *et al.* Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 160–169, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.07.030>

BEAULIEU, Jean-martin. A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. **Journal of psychiatry & neuroscience**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 7–16, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1503/jpn.110011>

BERMAN, Robert M. *et al.* Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 351–354, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(99\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(99)00230-9)

BERNARD, Véronique; SOMOGYI, Peter; BOLAM, J. Paul. Cellular, subcellular, and subsynaptic distribution of AMPA-type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 819–833, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-02-00819.1997>

BIALER, Meir; WHITE, H. Steve. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 68–82, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd2997>

BJARTMAR, Lisa *et al.* Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 26, n. 23, p. 6269–6281, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4212-05.2006>

BJARTMAR, Lisa *et al.* Long-term treatment with antidepressants, but not environmental stimulation, induces expression of NP2 mRNA in hippocampus and medial habenula. **Brain Research**, [S. l.], v. 1328, p. 25–33, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.004>

BLAESSE, Peter *et al.* Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. **Neuron**, [S. l.], v. 61, n. 6, p. 820–838, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.003>

BORGDORFF, Aren J.; CHOQUET, Daniel. Regulation of AMPA receptor lateral movements. **Nature**, [S. l.], v. 417, n. 6889, p. 649–653, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature00780>

BRACEY, James M. *et al.* Prolonged seizure activity leads to increased Protein Kinase A activation in the rat pilocarpine model of status epilepticus. **Brain Research**, [S. l.], v. 1283, p. 167–176, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.066>

CALABRESE, Francesca *et al.* Modulation of neuroplastic molecules in selected brain regions after chronic administration of the novel antidepressant agomelatine. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 215, n. 2, p. 267–275, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2129-8>

CARLÉN, Marie. What constitutes the prefrontal cortex? **Science**, [S. l.], v. 358, n. 6362, p. 478–482, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>

CARLEZON, William A.; DUMAN, Ronald S.; NESTLER, Eric J. The many faces of CREB. **Trends in Neurosciences**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 436–445, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.06.005>

CARVALHO, Ana Luísa; KAMEYAMA, Kimihiko; HUGANIR, Richard L. Characterization of Phosphorylation Sites on the Glutamate Receptor 4 Subunit of the AMPA Receptors. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 4748–4754, 1999.

CARVALHO, Cristiane Ribeiro de *et al.* The ERK phosphorylation levels in the amygdala predict anxiety symptoms in humans and MEK/ERK inhibition dissociates innate and learned defensive behaviors in rats. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01203-0>

CASTRÉN, Eero; HEN, René. Neuronal plasticity and antidepressant actions. **Trends in Neurosciences**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 259–267, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.12.010>

CASTRÉN, Eero; KOJIMA, Masami. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. **Neurobiology of Disease**, [S. l.], v. 97, p. 119–126, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.07.010>

CELADA, Pau *et al.* Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABAA, and glutamate receptors. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 21, n. 24, p. 9917–9929, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-24-09917.2001>

CELADA, Pau; VICTORIA PUIG, M.; ARTIGAS, Francesc. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. APR 2013, p. 1–20, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00025>

CHAN, Stella W. Y. *et al.* Hippocampal volume in vulnerability and resilience to depression. **Journal of Affective Disorders**, [S. l.], v. 189, p. 199–202, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.09.021>

CHANG, Michael C. *et al.* Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 13, p. 1090–1097, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn.2621>

CHANG, Simon *et al.* NPTX2 is a key component in the regulation of anxiety. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], n. May, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0091-z>

CHAPMAN, Georgina; SHANMUGALINGAM, Ushanthini; SMITH, Patrice D. The Role of Neuronal Pentraxin 2 (NP2) in Regulating Glutamatergic Signaling and Neuropathology. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 13, n. January, p. 1–6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00575>

CHATER, Thomas E.; GODA, Yukiko. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 8, n. NOV, p. 1–14, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00401>

CHEN, Biao *et al.* Increased Hippocampal BDNF Immunoreactivity in Subjects Treated with Antidepressant Medication. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 260–265, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01083-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01083-6)

CHO, Richard W. *et al.* mGluR1/5-dependent Long-Term Depression requires the regulated ectodomain cleavage of neuronal pentraxin NPR by TACE. **Neuron**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 858–871, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.010.mGluR1/5-dependent>

CIRIACO, Miriam *et al.* Corticosteroid-related central nervous system side effects. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, [S. l.], v. 4, n. SUPPL.1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0976-500X.120975>

CLEM, Roger L.; BARTH, Alison. Pathway-specific trafficking of native AMPARs by in vivo experience. **Neuron**, [S. l.], v. 49, n. 5, p. 663–670, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.019>

CONRAD, Cheryl D. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: The glucocorticoid vulnerability hypothesis. **Reviews in the Neurosciences**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 395–411, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2008.19.6.395>

COPPELL, A. L.; PEI, Q.; ZETTERSTRÖM, T. S. C. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 903–910, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00077-7)

CRYAN, John F.; PAGE, Michelle E.; LUCKI, Irwin. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology**, [S. l.], v. 182, n. 3, p. 335–344, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0093-5>

DALMAGRO, Ana Paula *et al.* Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in the antidepressant-like and neuroprotective effects of *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 314, n. 108843, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108843>

DE QUERVAIN, Dominique; SCHWABE, Lars; ROOZENDAAL, Benno. Stress, glucocorticoids and memory: Implications for treating fear-related disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 7–19, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/nrn.2016.155>

DELGADO, Pedro L. Depression: The case for a monoamine deficiency. **Journal of Clinical Psychiatry**, [S. l.], v. 61, n. SUPPL. 6, p. 7–11, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.4088/JCP.v61n0103>

DETKE, Michael J.; JOHNSON, Jennie; LUCKI, Irwin. Acute and Chronic Antidepressant Drug Treatment in the Rat Forced Swimming Test Model of Depression. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 107–112, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1037//1064-1297.5.2.107>

DINGLEDINE, Raymond *et al.* The glutamate receptor ion channels. **Pharmacological Reviews**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 7–61, 1999.

DODDS, D'Nette C. *et al.* Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 34, p. 21488–21494, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21488>

DOWLATSHAHI, Dar *et al.* Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. **The Lancet**, [S. l.], v. 352, n. 9142, p. 1754–1755, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79827-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79827-5)

DROZDOWICZ, Linda B.; BOSTWICK, J. Michael. Psychiatric Adverse Effects of Pediatric Corticosteroid Use. **Mayo Clinic Proceedings**, [S. l.], v. 89, n. 6, p. 817–834, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.MAYOCP.2014.01.010>

DU CLOS, Terry W. Pentraxins: Structure, Function, and Role in Inflammation. **ISRN Inflammation**, [S. l.], v. 2013, p. 1–22, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/379040>

DUMAN, Ronald S. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. **Depression and Anxiety**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 291–296, 2014 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/da.22227>. Neurobiology

DUMAN, Ronald S. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 11–27, 2014 b.

DUMAN, Ronald S. *et al.* Synaptic plasticity and depression: New insights from stress and rapid-acting antidepressants. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 238–249, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.4050>

DUMAN, Ronald S.; MONTEGGIA, Lisa M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013>

DUMAN, Ronald S.; SANACORA, Gerard; KRYSTAL, John H. Altered Connectivity in Depression : GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. **Neuron**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 75–90, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.013>

DUMAN, Ronald S.; VOLETI, Bhavya. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression : novel mechanisms for rapid-acting agents. **Trends in Neurosciences**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 47–56, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.004>

DURIC, Vanja *et al.* Altered expression of synapse and glutamate related genes in post-mortem hippocampus of depressed subjects. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 69–82, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1461145712000016>

DURIC, Vanja; DUMAN, Ronald S. Depression and treatment response: dynamic interplay of signaling pathways and altered neural processes. **Cellular and Molecular Life**

**Sciences**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 39–53, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1020-7>

EDWARD ROBERTS, R. *et al.* Abnormalities in white matter microstructure associated with chronic ketamine use. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 329–338, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2013.195>

ELBAZ, Idan *et al.* Reduced synaptic density and deficient locomotor response in neuronal activity-regulated pentraxin 2a mutant zebra fish. [S. l.], v. 29, n. 4, p. 1220–1234, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.14-258350>

ENGEL, Jerome. Excitation and inhibition in epilepsy. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 167–174, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0317167100038464>

ESTEBAN, José A. *et al.* PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. **Nature Neuroscience**, [S. l.], v. 6, p. 136–143, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn997>

EVERTS, Inga; VILLMANN, Carmen; HOLLMANN, Michael. N-glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 861–873, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/mol.52.5.861>

FEE, Corey; BANASR, Mounira; SIBILLE, Etienne. Somatostatin-Positive Gamma-Aminobutyric Acid Interneuron Deficits in Depression: Cortical Microcircuit and Therapeutic Perspectives. **Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 82, n. 8, p. 549–559, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.024>

FERGUSON, Brielle R.; GAO, Wen-jun. PV Interneurons : Critical Regulators of E/I Balance for Prefrontal Cortex-Dependent Behavior and Psychiatric Disorders. **Frontiers in neural circuits**, [S. l.], v. 12, n. 37, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00037>

FERRER, I. *et al.* Parvalbumin and calbindin-D28k immunocytochemistry in human neocortical epileptic foci. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 123, n. 1–2, p. 18–25, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(94\)90198-8](https://doi.org/10.1016/0022-510X(94)90198-8)

FERRETTI, Valentina *et al.* Phosphorylation of S845 GluA1 AMPA receptors modulates spatial memory and structural plasticity in the ventral striatum. **Brain Structure and Function**, [S. l.], v. 220, n. 5, p. 2653–2661, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0816-7>

FISHER, Robert S. *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.12550>

FLAVELL, Steven W.; GREENBERG, Michael E. Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 563–590, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631>

FOGAÇA, M'anoela V; DUMAN, Ronald S. Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions. **Frontiers in cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 13, n. 87, p. 1–20, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00087>

FREITAS, Andriara E. *et al.* Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. **Journal of Psychiatric Research**, [S. l.], v. 58, p. 137–146, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.07.024>

FREITAS, Andriara E. *et al.* Agmatine , by Improving Neuroplasticity Markers and

Inducing Nrf2 , Prevents Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 53, n. 5, p. 3030–3045, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9182-6>

FUMAGALLI, F. *et al.* Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 93, n. 6, p. 1551–1560, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03149.x>

GARCIA, Lêda S. B. *et al.* Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 140–144, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.07.027>

GEIGER, J. R. P. *et al.* Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. **Neuron**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 193–204, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90076-4)

GEK-MING, Sia *et al.* Interaction of the N-Terminal Domain of the AMPA Receptor GluR4 Subunit with the Neuronal Pentraxin NP1 Mediates GluR4 Synaptic Recruitment. **Neuron**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 87–102, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.020>

GHOSAL, Sriparna; HARE, Brendan; DUMAN, Ronald S. Prefrontal Cortex GABAergic Deficits and Circuit Dysfunction in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Stress and Depression. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [S. l.], n. 14, p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.09.012.Prefrontal>

GONÇALVES, Filipe Marques *et al.* Glutamatergic system and mTOR-signaling pathway participate in the antidepressant-like effect of inosine in the tail suspension test. **Journal of Neural Transmission**, [S. l.], v. 124, n. 10, p. 1227–1237, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1753-4>

GRAY, Jason D. *et al.* Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 661–673, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.97>

GRIGORENKO, Elena *et al.* Changes in glutamate receptor subunit composition in hippocampus and cortex in patients with refractory epilepsy. **Journal of the Neurological Sciences**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 35–45, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(97\)00180-9](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(97)00180-9)

GROTH, Rachel D.; MERMELSTEIN, Paul G. Brain-derived neurotrophic factor activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-dependent transcription: A role for the transcription factor NFATc4 in neurotrophin-mediated gene expression. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 23, n. 22, p. 8125–8134, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-22-08125.2003>

GU, Yu *et al.* Obligatory Role for the Immediate Early Gene NARP in Critical Period Plasticity. [S. l.], p. 335–346, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.016>

GULYÁS, Attila I. *et al.* Precision and Variability in Postsynaptic Target Selection of Inhibitory Cells in the Hippocampal CA3 Region. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 1729–1751, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1993.tb00240.x>

GULYÁS, Attila I. *et al.* Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 30, n. 45, p. 15134–15145, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4104-10.2010>

HASSANI, Faezeh Vahdati *et al.* Antidepressant effects of crocin and its effects on transcript and protein levels of CREB, BDNF, and VGF in rat hippocampus. [*S. l.*], v. 22, n. 1, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2008-2231-22-16>

HAUSER, WA. The natural history of drug resistant epilepsy: epidemiologic considerations. **Epilepsy Research**, [*S. l.*], v. 5, p. 25–28, 1992.

HENLEY, Jeremy M.; WILKINSON, Kevin A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [*S. l.*], v. 17, n. 6, p. 337–350, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.37>

HOLLMANN, M. Cloned Glutamate Receptors. **Annual Review of Neuroscience**, [*S. l.*], v. 17, n. 1, p. 31–108, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.17.1.31>

HSIUNG, Shu-chi *et al.* Attenuated 5-HT 1A receptor signaling in brains of suicide victims : involvement of adenylyl cyclase , phosphatidylinositol 3-kinase , Akt and mitogen-activated protein kinase. **Journal of Neurochemistry**, [*S. l.*], v. 87, p. 182–194, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01987.x>

HU, Hua; GAN, Jian; JONAS, Peter. Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. **Science**, [*S. l.*], v. 345, n. 6196, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1255263>

HUANG, Eric J.; REICHARDT, Louis F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annual Review of biochemistry**, [*S. l.*], v. 72, p. 609–642, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>

HUGANIR, Richard L.; NICOLL, Roger A. AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. **Neuron**, [*S. l.*], v. 80, n. 3, p. 704–717, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.025>

ISAACSON, Jeffrey S.; SCANZIANI, Massimo. How Inhibition Shapes Cortical Activity. **Neuron**, [*S. l.*], v. 72, n. 2, p. 231–243, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.027>

JACQUES, Amanda V. *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, [*S. l.*], v. 62, n. 6, p. 836–842, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.020>

JIN, Hui-juan *et al.* Alleviative effects of fluoxetine on depressive-like behaviors by epigenetic regulation of BDNF gene transcription in mouse model of post-stroke depression. **Scientific Reports**, [*S. l.*], v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13929-5>

JONAS, P. *et al.* Differences in Ca<sup>2+</sup> permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. **Neuron**, [*S. l.*], v. 12, n. 6, p. 1281–1289, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90444-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90444-8)

JU, William *et al.* Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. **Nature Neuroscience**, [*S. l.*], v. 7, n. 3, p. 244–253, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn1189>

KANN, Oliver. The interneuron energy hypothesis: Implications for brain disease. **Neurobiology of Disease**, [*S. l.*], v. 90, p. 75–85, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.005>

KANN, Oliver; PAPAGEORGIOU, Ismini E.; DRAGUHN, Andreas. Highly energized inhibitory interneurons are a central element for information processing in cortical networks. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, [*S. l.*], v. 34, n. 8, p. 1270–1282, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.104>

KASTER, Manuella P. *et al.* Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine. **Pharmacological Reports**, [S. l.], v. 64, n. 3, p. 706–713, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70865-4](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70865-4)

KAVALALI, Ege T.; MONTEGGIA, Lisa M. Synaptic mechanisms underlying rapid antidepressant action of ketamine. **American Journal of Psychiatry**, [S. l.], v. 169, n. 11, p. 1150–1156, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.12040531>

KAZI, Sana Elham; HOQUE, Sheikh. Acute Psychosis Following Corticosteroid Administration. **Cureus**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 9–13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/cureus.18093>

KESSELS, Helmut W.; MALINOW, Roberto. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. **Neuron**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 340–350, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.015>

KIELLAND, Anders *et al.* Activity Patterns Govern Synapse-Specific AMPA Receptor Trafficking between Deliverable and Synaptic Pools. **Neuron**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 84–101, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.03.001>

KNIERIM, James J. The hippocampus. **Current Biology**, [S. l.], v. 25, n. 23, p. 1116–1121, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.10.049>

KOWIAŃSKI, Przemysław *et al.* BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. 579–593, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>

KRYSTAL, John H. Ketamine and the potential role for rapid-acting antidepressant medications. **Swiss Medical Weekly**, [S. l.], v. 137, n. 15–16, p. 215–216, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4414/smw.2007.11932>

LANAHAN, Anthony; WORLEY, Paul. Immediate-early genes and synaptic function. **Neurobiology of Learning and Memory**, [S. l.], v. 70, n. 1–2, p. 37–43, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3836>

LEAL, Rodrigo Bainy *et al.* Amygdala levels of the GluA1 subunit of glutamate receptors and its phosphorylation state at serine 845 in the anterior hippocampus are biomarkers of ictal fear but not anxiety. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 25, p. 655–665, 2020.

LEE, Hey Kyoung *et al.* Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. **Nature**, [S. l.], v. 405, n. 6789, p. 955–959, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35016089>

LEE, Sung-jin *et al.* Presynaptic Neuronal Pentraxin Receptor Organizes Excitatory and Inhibitory Synapses. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 1062–1080, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2768-16.2016>

LEPACK, Ashley E. *et al.* Fast-Acting Antidepressants Rapidly Stimulate ERK Signaling and BDNF Release in Primary Neuronal Cultures. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 111, p. 242–252, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.09.011>

LI, Jie *et al.* PI3K/AKT/JNK/p38 signalling pathway-mediated neural apoptosis in the prefrontal cortex of mice is involved in the antidepressant-like effect of pioglitazone. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 525–535, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12918>

LI, Nanxin *et al.* mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, [S. l.], v. 329, n. 5994, p. 959–964, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1190287>

LI, Qi *et al.* Chronic ketamine exposure causes white matter microstructural abnormalities in adolescent cynomolgus monkeys. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 11, n. MAY, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00285>

LIU, Jinping *et al.* Analysis of the Expressions of TrkB and GLT-1 in Brain Tissues

on a Rat Pentylentetrazol Kindling Model of Chronic Epilepsy. **Turkish neurosurgery**, [*S. l.*], v. 26, n. 5, p. 736–743, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.13533-14.1>

LIU, Qingqing *et al.* Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study. **Journal of Psychiatric Research**, [*S. l.*], v. 126, p. 134–140, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.08.002>

LLADÓ-PELFORT, Laia *et al.* 5-HT 1A Receptor agonists enhance pyramidal cell firing in prefrontal cortex through a preferential action on GABA interneurons. **Cerebral Cortex**, [*S. l.*], v. 22, n. 7, p. 1487–1497, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr220>

LOBATO, Kelly R. *et al.*  $\alpha$ -Tocopherol administration produces an antidepressant-like effect in predictive animal models of depression. **Behavioural Brain Research**, [*S. l.*], v. 209, n. 2, p. 249–259, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.002>

LOPES, M. W. *et al.* A single high dose of dexamethasone affects the phosphorylation state of glutamate AMPA receptors in the human limbic system. **Translational Psychiatry**, [*S. l.*], v. 6, n. 12, p. e986-9, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/tp.2016.251>

LOPES, Mark William *et al.* Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemical Research**, [*S. l.*], v. 37, n. 9, p. 1868–1878, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0797-y>

LOPES, Mark William *et al.* Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. **Experimental Brain Research**, [*S. l.*], v. 226, n. 2, p. 153–163, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00221-013-3421-8>

LOPES, Mark William *et al.* Region-specific alterations of AMPA receptor phosphorylation and signaling pathways in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemistry International**, [*S. l.*], v. 87, p. 22–33, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.05.003>

LOPES, Mark William *et al.* Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, [*S. l.*], v. 55, p. 92–100, 2016 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.001>

LOPES, Mark William *et al.* Knockdown of carboxypeptidase A6 in zebrafish larvae reduces response to seizure-inducing drugs and causes changes in the level of mRNAs encoding signaling molecules. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 11, n. 4, p. 1–19, 2016 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152905>

LUCHKINA, Natalia V *et al.* Developmental switch in the kinase dependency of long-term potentiation depends on expression of GluA4 subunit-containing AMPA receptors. [*S. l.*], v. 111, n. 11, p. 1–6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1315769111>

LUSCHER, B.; SHEN, Q.; SAHIR, N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, [*S. l.*], v. 16, n. 4, p. 383–406, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mp.2010.120>

LUSSIER, Marc P.; SANZ-CLEMENTE, Antonio; ROCHE, Katherine W. Dynamic regulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by posttranslational modifications. **Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 290, n. 48, p. 28596–28603, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.652750>

MAAS, Stefan *et al.* A-to-I RNA Editing and Human Genetic Disease. **RNA Biology**, [*S. l.*], v. 3, n. 1, p. 1–9, 2006. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0024625>

MACHADO, Daniele G. *et al.* Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 220–229, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.08.024>

MAHESHWARI, Atul; NAHM, Walter K.; NOBELS, Jeffrey L. Paradoxical proepileptic response to NMDA receptor blockade linked to cortical interneuron defect in stargazer mice. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [S. l.], v. 7, n. 156, p. 1–11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00156>

MALENKA, Robert C.; BEAR, Mark F. LTP and LTD: An embarrassment of riches. **Neuron**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 5–21, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>

MARIGA, Abigail *et al.* Definition of a Bidirectional Activity-Dependent Pathway Involving BDNF and Narp. **Cell Reports**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1747–1756, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.064>

MARSDEN, W. N. Synaptic plasticity in depression: Molecular, cellular and functional correlates. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, [S. l.], v. 43, p. 168–184, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2012.12.012>

MATSUDA, Satoru *et al.* Roles of PI3K/AKT/GSK3 Pathway Involved in Psychiatric Illnesses. **Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 22, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diseases7010022>

MCBAIN, Chris J.; FISAHN, André. Interneurons unbound. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 11–23, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35049047>

MÉNDEZ, Pablo *et al.* Direct Alteration of a Specific Inhibitory Circuit of the Hippocampus by Antidepressants. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 32, n. 47, p. 16616–16628, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1720-12.2012>

MIKASOVA, Lenka *et al.* Stress hormone rapidly tunes synaptic NMDA receptor through membrane dynamics and mineralocorticoid signalling. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08695-3>

MILES, Richard *et al.* Differences between Somatic and Dendritic Inhibition in the Hippocampus. **Neuron**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 815–823, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80101-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80101-4)

MONTEGGIA, Lisa M.; BJ, Carl. BDNF e a key transducer of antidepressant effects. **Neuropharmacology**, [S. l.], v. 102, p. 72–79, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.034>

MONYER, H.; SEEBURG, P. H.; WISDEN, W. Glutamate-operated channels: Developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. **Neuron**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 799–810, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90176-Z](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90176-Z)

NATIONAL INSTITUTE FOR CLINICAL EXCELLENCE. **Depression : management of depression in primary and secondary care**. London: [s. n.], 2004.

NIBUYA, Masashi; MORINOBU, Shigeru; DUMAN, Ronald S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in Rat Brain by Chronic Electroconvulsive Seizure and Antidepressant Drug Treatments. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 15, n. 11, p. 7539–7547, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-11-07539.1995>

NIBUYA, Masashi; NESTLER, Eric J.; DUMAN, S. Chronic Antidepressant Administration Increases Expression of CAMP Response Element Binding Protein ( CREB ) in Rat Hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 2365–2372, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-07-02365.1996>

O'BRIEN, Richard *et al.* Synaptically Targeted Narp Plays an Essential Role in the Aggregation of AMPA Receptors at Excitatory Synapses in Cultured Spinal Neurons. *[S. l.]*, v. 22, n. 11, p. 4487–4498, 2002.

O'BRIEN, Richard J. *et al.* Synaptic Clustering of AMPA Receptors by the Extracellular Immediate-Early Gene Product Narp. **Neuron**, *[S. l.]*, v. 23, n. 2, p. 309–323, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80782-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80782-5)

O'BRIEN, Richard J.; LAU, Lit-fui; HUGANIR, Richard L. Molecular mechanisms excitatory synapses of glutamate receptor clustering at. *[S. l.]*, p. 364–369, 1998.

OSERA, Cecilia *et al.* Pentraxins and Alzheimer ' s disease : At the interface between biomarkers and pharmacological targets. **Ageing Research Reviews**, *[S. l.]*, v. 11, n. 2, p. 189–198, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.12.004>

OSSO, Liliana Dell *et al.* Depression, Serotonin and Tryptophan. **Current Pharmaceutical Design**, *[S. l.]*, v. 22, n. 8, p. 949–954, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612822666151214104826>

PARK, Hyungju; POO, Mu Ming. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nature Reviews Neuroscience**, *[S. l.]*, v. 14, n. 1, p. 7–23, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrn3379>

PELKEY, Kenneth A. *et al.* Pentraxins Coordinate Excitatory Synapse Maturation and Circuit Integration of Parvalbumin Interneurons. **Neuron**, *[S. l.]*, v. 85, n. 6, p. 1257–1272, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.020>

PELKEY, Kenneth A. *et al.* Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. **Physiological Reviews**, *[S. l.]*, v. 97, p. 1619–1747, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>

PERES, Tanara Vieira *et al.* In Vitro Manganese Exposure Disrupts MAPK Signaling Pathways in Striatal and Hippocampal Slices from Immature Rats. **BioMed Research International**, *[S. l.]*, v. 2013, n. 769295, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/769295>

PEREZ-CABALLERO, Laura *et al.* Drug Discovery Case History Fluoxetine : a case history of its discovery and preclinical development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, *[S. l.]*, v. 9, n. 5, p. 567–578, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.907790>

PEREZ-CABALLERO, Laura *et al.* Monoaminergic system and depression. **Cell and Tissue Research**, *[S. l.]*, v. 377, n. 1, p. 107–113, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2978-8>

PETERSON, Gary L. A simplification of the Protein Assay Method of Lowry *et al.* Which is More Generally Applicable. **Analytical Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 83, n. 2, p. 346–356, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)

PETIT-DEMOULIERE, Benoit; CHENU, Franck; BOURIN, Michel. Forced swimming test in mice : a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, *[S. l.]*, v. 177, n. 3, p. 245–255, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2048-7>

PICKARD, J. *et al.* Investigation into the tribological condition of acetabular tissue after bipolar joint replacement hip surgery. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, *[S. l.]*, v. 214, n. 4, p. 361–370, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1243/0954411001535408>

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: A primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, *[S. l.]*, v. 229, n. 2, p. 327–336, 1977.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, *[S. l.]*, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/266730a0>

PORSOLT, Roger D. *et al.* Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 47, n. 4, p. 379–391, 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(78\)90118-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(78)90118-8)

PORTER, Brenda E.; CUI, Xiao Nan; BROOKS-KAYAL, Amy R. Status epilepticus differentially alters AMPA and kainate receptor subunit expression in mature and immature dentate granule neurons. **European Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 23, n. 11, p. 2857–2863, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04839.x>

PUIG, M. Victoria; ARTIGAS, Francesc; CELADA, Pau. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: Involvement of serotonin and GABA. **Cerebral Cortex**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–14, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh104>

RADLEY, Jason J.; GOSSELINK, Kristin L.; SAWCHENKO, Paul E. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 29, n. 22, p. 7330–7340, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5924-08.2009>

RAFA-ZABŁOCKA, Katarzyna *et al.* Selective Depletion of CREB in Serotonergic Neurons Affects the Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Evoked by Chronic Fluoxetine Treatment. **Frontiers in Neuroscience**, [S. l.], v. 12, n. September, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00637>

RAME, Marion *et al.* Clozapine counteracts a ketamine-induced depression of hippocampal-prefrontal neuroplasticity and alters signaling pathway phosphorylation. **PLoS One**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 1–20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177036>

RETI, Irving M. *et al.* Prominent Narp expression in projection pathways and terminal fields. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 82, n. 4, p. 935–944, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01051.x>

RETI, Irving M.; BARABAN, Jay M. Sustained Increase in Narp Protein Expression Following Repeated Electroconvulsive Seizure. **Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 439–443, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00120-2](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00120-2)

RIEGER, Débora K. *et al.* Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 122, p. 53–60, 2014 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.03.008>

RIEGER, Débora K. *et al.* ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 27, n. 12, p. 746–754, 2014 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmr.2401>

RIGA, Danai *et al.* Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [S. l.], v. 8, n. DEC, p. 1–19, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00230>

RODRIGUES, Ana Lúcia S. *et al.* Effect of Perinatal Lead Exposure on Rat Behaviour in Open-Field and Two-Way Avoidance Tasks. **Pharmacology & Toxicology**, [S. l.], v. 79, n. 3, p. 150–156, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00259.x>

RONALD S. DUMAN; AGHAJANIAN, George K. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. **Science**, [S. l.], v. 338, n. 6013, p. 68–72, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1222939>.Synaptic

RONSONI, MF *et al.* Mitochondrial Respiration Chain Enzymatic Activities in the Human Brain: Methodological Implications for Tissue Sampling and Storage. **Neurochemical research**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 880–891, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11064->

015-1769-9. Acesso em: 15 jul. 2021.

ROTARU, Diana C.; LEWIS, David A.; GONZALEZ-BURGOS, Guillermo. The role of glutamatergic inputs onto parvalbumin-positive interneurons: Relevance for schizophrenia. **Reviews in the Neurosciences**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 97–109, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2011-0059>

RUDY, Bernardo *et al.* Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. **Developmental Neurobiology**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 45–61, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/dneu.20853>.Three

RUSSI, Michael A. *et al.* ConBr, a lectin from canavalia brasiliensis seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochemical Research**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 288–297, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0608-x>

SALVADORE, Giacomo; SINGH, Jaskaran B. Ketamine as a Fast Acting Antidepressant: Current Knowledge and Open Questions. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 428–436, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cns.12103>

SANDERSON, Jennifer L.; DELL'ACQUA, Mark L. AKAP signaling complexes in regulation of excitatory synaptic plasticity. **Neuroscientist**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 321–336, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1073858410384740>

SANDERSON, Jennifer L.; GORSKI, Jessica A.; DELL'ACQUA, Mark L. NMDA Receptor-Dependent LTD Requires Transient Synaptic Incorporation of Ca<sup>2+</sup>-Permeable AMPARs Mediated by AKAP150-Anchored PKA and Calcineurin. **Neuron**, [S. l.], v. 89, n. 5, p. 1000–1015, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.043>

SANTANA, Noemí *et al.* Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 1100–1109, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh070>

SAUER, Jonas Frederic; STRÜBER, Michael; BARTOS, Marlene. Impaired fast-spiking interneuron function in a genetic mouse model of depression. **eLife**, [S. l.], n. 4, p. 1–20, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.04979>

SHEPHERD, Jason D.; HUGANIR, Richard L. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 23, p. 613–643, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123516>

SIGURDSSON, Torfi; DUVARCI, Sevil. Hippocampal-prefrontal interactions in cognition, behavior and psychiatric disease. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [S. l.], v. 9, n. 190, p. 1–18, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnsys.2015.00190>

SLATTERY, David A.; CRYAN, John F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>

SLOVITER, Robert S. *et al.* Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. **Journal of Comparative Neurology**, [S. l.], v. 308, n. 3, p. 381–396, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cne.903080306>

SOHAL, Vikaas S. *et al.* Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. **Nature**, [S. l.], v. 459, n. 7247, p. 698–702, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature07991>

SOHAL, Vikaas S.; RUBENSTEIN, John L. R. Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0426-0>

SOMOGYI, P. *et al.* Synaptic connections of morphologically identified and

physiologically characterized large basket cells in the striate cortex of cat. **Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 261–294, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(83\)90133-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(83)90133-1)

SONG, Insuk; HUGANIR, Richard L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. [S. l.], v. 25, n. 11, p. 578–588, 2002.

SPRENGEL, Rolf. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 326, n. 2, p. 447–455, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0275-4>

STARK, Eran *et al.* Pyramidal cell-interneuron interactions underlie hippocampal ripple oscillations. **Neuron**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 467–480, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.023>

THOENEN, Hans. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, [S. l.], v. 270, n. 5236, p. 593–598, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.270.5236.593>

THOME, J. *et al.* cAMP Response Element-Mediated Gene Transcription Is Upregulated by Chronic Antidepressant Treatment. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 4030–4036, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04030.2000>

TSUI, Cynthia C. *et al.* Narp, a Novel Member of the Pentraxin Family, Promotes Neurite Outgrowth and Is Dynamically Regulated by Neuronal Activity. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 2463–2478, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-08-02463.1996>

VERES, Judit M. *et al.* Strategically positioned inhibitory synapses of axo-axonic cells potently control principal neuron spiking in the basolateral amygdala. **Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 34, n. 49, p. 16194–16206, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2232-14.2014>

WANG, Chunmei *et al.* Brain damages in ketamine addicts as revealed by magnetic resonance imaging. **Frontiers in Neuroanatomy**, [S. l.], v. 7, n. JUNE, p. 1–8, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnana.2013.00023>

WANG, John Q. *et al.* Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 728, n. 1, p. 183–187, 2014 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.019>

WANG, John Q.; MAO, Limin. The ERK Pathway : Molecular Mechanisms and Treatment of Depression. **Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 56, n. 9, p. 6197–6205, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1524-3>

WANG, Qiong; SHAO, Feng; WANG, Weiwen. Region-Dependent Alterations in Cognitive Function and ERK1/2 Signaling in the PFC in Rats after Social Defeat Stress. **Neural Plasticity**, [S. l.], v. 2018, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/9870985>

WANG, Yubin *et al.* A molecular brake controls the magnitude of long-term potentiation. **Nature Communications**, [S. l.], v. 5, n. 3051, p. 1–26, 2014 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms4051.A>

WARRINGTON, Thomas P.; BOSTWICK, J. Michael. Psychiatric Adverse Effects of Corticosteroids. **Mayo Clinic Proceedings**, [S. l.], v. 81, n. 10, p. 1361–1367, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.4065/81.10.1361>

WIESER, Heinz Gregor. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 695–714, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.09004.x>

WONG, David T.; PERRY, Kenneth W.; BYMASTER, Frank P. The Discovery of Fluoxetine Hydrochloride (Prozac). **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 764–774, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd1821>

WOOLFREY, Kevin M.; DELL'ACQUA, Mark L. Coordination of protein phosphorylation and dephosphorylation in synaptic plasticity. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 290, n. 48, p. 28604–28612, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.657262>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders Global Health Estimates**. Geneva: [s. n.], 2017. *E-book*.

XU, Desheng *et al.* Narp and NP1 Form Heterocomplexes that Function in Developmental and Activity-Dependent Synaptic Plasticity. [S. l.], v. 39, p. 513–528, 2003.

XU, Ke *et al.* Validation of the targeted metabolomic pathway in the hippocampus and comparative analysis with the prefrontal cortex of social defeat model mice. **Journal of Neurochemistry**, [S. l.], v. 149, n. 6, p. 799–810, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.14641>

YANG, Weiguo; SUN, Qian-quan. Circuit-specific and neuronal subcellular-wide E-I balance in cortical pyramidal cells. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22314-9>

ZAFRA, F. *et al.* Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 3545–3550, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07564.x>

ZALETEL, Ivan; FILIPOVIĆ, Dragana; PUŠKAŠ, Nela. Chronic stress, hippocampus and parvalbumin-positive interneurons: What do we know so far? **Reviews in the Neurosciences**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 397–409, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2015-0042>

ZANOS, Panos *et al.* NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. **Nature**, [S. l.], v. 533, n. 7604, p. 481–486, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature17998.NMDAR>

ZHANG, Guang Fen *et al.* Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 110, p. 8–12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.05.010>

ZHOU, W. *et al.* Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. **European Psychiatry**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 419–423, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2013.10.005>

ZHU, J. Julius *et al.* Postnatal synaptic potentiation : Delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. [S. l.], v. 3, n. 11, 2000.

## ANEXO A – Artigo publicado da tese

Metabolic Brain Disease (2021) 36:711–722  
<https://doi.org/10.1007/s11011-021-00675-x>

ORIGINAL ARTICLE



## Neuronal activity regulated pentraxin (narp) and GluA4 subunit of AMPA receptor may be targets for fluoxetine modulation

Isabella A. Heinrich<sup>1,2</sup> · Andiana E. Freitas<sup>2,3</sup> · Ingrid A. V. Wolin<sup>2,3</sup> · Ana Paula M. Nascimento<sup>2,3</sup> · Roger Walz<sup>1,4,5</sup> · Ana Lúcia S. Rodrigues<sup>1,2,3</sup> · Rodrigo B. Leal<sup>1,2,3</sup>

Received: 21 November 2020 / Accepted: 22 January 2021 / Published online: 2 February 2021  
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Fluoxetine is the foremost prescribed antidepressant. Drugs acting on monoaminergic system may also regulate glutamatergic system. Indeed, the investigation of proteins associated with this system, such as Narp (neuronal activity-dependent pentraxin) and GluA4 subunit of AMPA receptor may reveal poorly explored modulations triggered by conventional antidepressants. This study aimed to uncover neurochemical mechanisms underlying the chronic fluoxetine treatment, mainly by evaluating these protein targets in the prefrontal cortex and in the hippocampus. Mice received a daily administration of fluoxetine (0.1, 1 or 10 mg/kg, p.o.) or potable water (vehicle group) for 21 days. These animals were submitted to the forced swim test (FST) to verify antidepressant-like responses and the open-field test (OFT) to assess locomotor activity. Modulation of signaling proteins was analyzed by western blot. Chronic treatment with fluoxetine (1 and 10 mg/kg) was effective, since it reduced the immobility time in the FST, without altering locomotor activity. Fluoxetine 10 mg/kg increased CREB phosphorylation and BDNF expression in the prefrontal cortex and hippocampus. Noteworthy, in the hippocampus fluoxetine also promoted Akt activation and augmented Narp expression. In the prefrontal cortex, a significant decrease in the expression of the GluA4 subunit and Narp were observed following fluoxetine administration (10 mg/kg). The results provide evidence of novel molecular targets potentially involved in the antidepressant effects of fluoxetine, since in mature rodents Narp and GluA4 are mainly expressed in the GABAergic parvalbumin-positive (PV+) interneurons. This may bring new insights into the molecular elements involved in the mechanisms underlying the antidepressant effects of fluoxetine.

**Keywords** GluA4 · Narp · Fluoxetine · Antidepressant · Prefrontal cortex · Hippocampus

✉ Rodrigo B. Leal  
 rbleal@gmail.com

<sup>1</sup> Graduate Program in Neuroscience Federal University of Santa Catarina Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences Federal University of Santa Catarina Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>3</sup> Graduate Program in Biochemistry Federal University of Santa Catarina Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>4</sup> Department of Clinical Medicine, Center of Health Sciences, University Hospital Federal University of Santa Catarina Campus Universitário, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>5</sup> Center of Applied Neuroscience (CeNAp), University Hospital Federal University of Santa Catarina Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

### Introduction

Major depressive disorder (MDD) is a debilitating and recurrent psychiatric disorder, considered one of the main foundations of incapability worldwide. It is a highly prevalent disease, affecting over 320 million people at a global level (World Health Organization 2017). Between 2005 and 2015, the total estimated number of people who suffer from MDD raised 18,4 % and it continues increasing due to the population expansion among the groups in which MDD is more prevalent (GBD 2015; Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators 2016). It is well established that the disruption of the serotonergic system is an important feature in the MDD pathophysiology (Dell’Osso et al. 2016). Based on this comprehension, the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have been the first choice for pharmacological antidepressant treatment (National Institute for Clinical Excellence 2004). Since its clinical introduction in 1988 (Wong et al. 2005),