

MANUELLA PINTO KASTER

**Envolvimento do sistema adenosinérgico em modelos
de estresse e depressão**

Florianópolis

2008

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

**Envolvimento do sistema adenosinérgico em modelos
de estresse e depressão**

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

Orientadora: Prof^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis

2008

*“Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida.”*

Carlos Drummond de Andrade

Serei eternamente grata...

À Professora Ana Lúcia pela orientação deste trabalho e principalmente por todos os ensinamentos, que além de científicos foram ensinamentos de caráter, dedicação e profissionalismo. Obrigada pela amizade, carinho, pelo apoio incondicional e confiança depositada em mim nestes seis anos, és com certeza a responsável pela minha opção pela pesquisa! Obrigada por tudo!

Ao Professor Rodrigo Cunha agradeço imensamente a excelente oportunidade que me deu de fazer parte do seu grupo de trabalho. Obrigada pela confiança e pela possibilidade de retornar.

Aos Professores da Neurociências, em especial ao professor Adair R.S.Santos, obrigada pelo apoio, pela disponibilidade com que sempre leu os meus trabalhos e pelas inúmeras sugestões que contribuíram imensamente.

Aos amigos que tive a sorte de conhecer e conviver diariamente no laboratório de Neurobiologia da Depressão: Patrícia, Josi, Kelly, Ricardo, Dani, Maurício, Luís, Chandra, Juliano, Andiana, Jardel, Obrigada pelos cafés... histórias, mas principalmente pela amizade e apoio, é muito bom trabalhar com vocês! Angelo, Michela, Roberto e Priscila, a passagem de vocês pelo laboratório não foi esquecida, muito obrigada por tudo! Josi, Rica e Dani, obrigada pela colaboração direta nos experimentos, este trabalho é de vocês também!!! Pati... agradeço ainda pelo “grande oráculo”!!

À Paula Canas e Joana Salgado, minhas “chefinhas” em Coimbra, não tenho palavras para agradecer tudo que vocês fizeram por mim. Obrigada pela paciência que sempre tiveram em ensinar! Agradeço a colaboração e o imenso apoio na realização deste trabalho. Agradeço também a amizade e o carinho que sempre tiveram... Obrigada, raparigas!!

Aos meus colegas e amigos do laboratório em Coimbra, agradeço a companhia e a ajuda: Bibi, Giana, Patrícia, João, Áttila, Samira, Rui e Carla. Em especial à Bibi e Gi, minha passagem por Coimbra jamais teria sido a mesma coisa sem vocês. Obrigada por terem sido minhas “irmãzinhas” e por terem tornado a vida longe de casa tão mais fácil!

À professora Cláudia Cavadas pela oportunidade que me deu de trabalhar em colaboração, obrigada pela disponibilidade e pela maneira sempre gentil e paciente com que respondeu minhas dúvidas. À Vera, amiga querida e sempre disposta a ajudar... mesmo quando o HPLC não queria ajudar!!

Ao Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, em especial aos responsáveis pelo Biotério, Carmen, Alexandre e Fátima. Os longos meses de tratamento e manipulação dos animais teriam sido impossíveis sem a ajuda de vocês.

À Prof. Christa E. Muller, da Universidade de Bonn, Alemanha, pela síntese do composto KW6002.

Ao Nivaldo, secretário do curso de pós graduação em Neurociências, por ser sempre tão solícito e competente!

À CAPES pela bolsa que me foi concedida para a concretização deste trabalho.

Aos Amigos, que fora do laboratório me acompanharam neste percurso, agradeço as palavras de incentivo e de amizade que me deram nestes últimos anos, em especial: Juliana, Michelle, Lízia e Marcos. Aos amigos que ganhei em Coimbra: Ivan, Joana Costa, Joana Salgado, Marco, Inês Morte e Bruno... é impressionante a maneira como vocês entraram na minha vida! Obrigada pela companhia, pelos cafés e copos... Adoro vocês!

À minha família, obrigada por tornarem possível a realização dos meus sonhos e por vibrarem pelas minhas conquistas muitas vezes mais do que eu mesma! Mãe, Pai, Michelle, Tia Isolde e Tio Arlindo, Zuleika e Aureo, Vó e Tia Suela. Obrigada por acreditarem e confiarem em mim, e sobretudo por compreenderem a minha “ausência”. Amo vocês!

Parte dos resultados apresentados neste trabalho estão publicados em revistas científicas indexadas:

KASTER, M.P., FERREIRA, P.K., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Effects of potassium channel inhibitors in the forced swimming test: possible involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway. *Behav. Brain Res.*, 165:204-9, 2005.

KASTER, M.P., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Brain Res. Bull.*, 67:53-61, 2005.

KASTER, M.P., ROSA, A.O., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 8:601-6, 2005.

KASTER, M.P., BUDNI, J., BINFARÉ, R.W., SANTOS, A.R.S. RODRIGUES, A.L.S. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 31:690-6, 2007.

KASTER, M.P., BUDNI, J., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Pharmacological evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.*, 576:91-8, 2007.

Outros trabalhos realizados em paralelo durante o período do Doutorado:

BARAUNA, S.C., KASTER, M.P., HECKERT, B.T., DO NASCIMENTO, K.S., ROSSI, F.M., TEIXEIRA, E.H., CAVADA, B.S., RODRIGUES, A.L.S., LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 85:160-9, 2006.

MANTOVANI, M., KASTER, M.P., PERTILE, R., CALIXTO, J.B., RODRIGUES, A.L.S., SANTOS, A.R.S. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *J Pineal Res.*, 41:382-9, 2006.

MACHADO, D.G., KASTER, M.P., BINFARÉ, R.W., DIAS, M., SANTOS, A.R.S., PIZZOLATTI, M.G., BRIGHENTE, I.M., RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 31:421-8, 2006

KASTER, M.P., RAUPP, I., BINFARÉ, R.W., ANDREATINI, R., RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur. J. Pharmacol.*, 565:119-24, 2007.

BUDNI, J., GADOTTI, V.M., KASTER, M.P., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L. Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of agmatine in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.*, 575:87-93, 2007.

BROCARDO, P.S., BUDNI, J., KASTER, M.P., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology*, 54:464-73, 2007.

ROSA, A.O., KASTER, M.P., BINFARÉ, R.W., MORALES, S., MARTÍN-APARICIO, E., NAVARRO-RICO, M.L., MARTINEZ, A., MEDINA, M., GARCÍA, A.G., LÓPEZ, M.G., RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 32:1549-56, 2008.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. DEPRESSÃO	15
1.2. ANTIDEPRESSIVOS	17
1.3. DEPRESSÃO E ESTRESSE	20
1.4. MODELOS ANIMAIS	22
2. SISTEMA ADENOSINÉRGICO	24
2.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA	24
2.2. FORMAÇÃO E METABOLISMO	26
2.3. RECEPTORES DE ADENOSINA	28
2.4. EFEITOS AGUDOS E CRÔNICOS	30
2.5. SISTEMA ADENOSINÉRGICO NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE E DEPRESSÃO	31
3. OBJETIVOS	35
3.1. OBJETIVO GERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS	36
1. TESTES COMPORTAMENTAIS	37
1.1. TESTE DO NADO FORÇADO (TNF)	37
1.2. TESTE DO CAMPO ABERTO	37
1.3. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	38
1.4. LABIRINTO EM Y	38
2. AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DA ADENOSINA NO TNF	39
2.1. VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DOS COMPOSTOS	40
2.2. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	41
2.3. ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO (NO)	42
2.4. ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE POTÁSSIO (K ⁺)	43
2.5. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO	44
2.6. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE	45
3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CAFEÍNA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NA NEUROPLASTICIDADE INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL (ECI)	47
3.1. ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL (ECI)	47
3.2. DOSAGEM DE CORTICOSTERONA E CAFEÍNA PLASMÁTICA	49
3.3. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	49
3.3.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE MEMBRANAS TOTAIS E SINAPTOSSOMAS	49
3.3.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS	50
3.3.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E SDS-PAGE E WESTERN BLOT	50
3.4. HISTOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA	51
3.4.1. FLUORO JADE C	52
3.4.2. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA CD11b	53
3.4.3. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA GFAP	53
3.4.4. ANÁLISE DAS IMAGENS	54
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
CAPÍTULO 3 – EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ADENOSINA NO TNF: MECANISMO DE AÇÃO	55
1. INTRODUÇÃO	56
1.1. RECEPTORES NMDA E VIA L-ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO	56
1.2. CANAIS DE POTÁSSIO	60
1.3. SISTEMA SEROTONINÉRGICO	62
1.4. RECEPTORES OPIÓIDES	66
2. RESULTADOS	68
2.1. EFEITO DA ADENOSINA E DO DIPIRIDAMOL NO TNF	68

2.2. ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA E DA VIA L-ARGININA-NO NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA ADENOSINA NO TNF	69
2.2. ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE K ⁺ NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA ADENOSINA NO TNF	73
2.3. ENVOLVIMENTO DOS SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA ADENOSINA NO TNF	79
2.4. ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES OPIÓIDES NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA ADENOSINA NO TNF	84
3. DISCUSSÃO	87
3.1 EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA ADENOSINA NO TNF	87
3.2. ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA E DA VIA DA L-ARGININA-NO	90
3.4. ENVOLVIMENTO DOS CANAIS DE K ⁺	94
3.5. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO	96
3.5. ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE	99
3.6. INTEGRAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS.....	101
CAPÍTULO 4 - O CONSUMO CRÔNICO DE CAFEÍNA E AS ALTERAÇÕES NA NEUROPLASTICIDADE E NO PERFIL COMPORTAMENTAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO ECI.....	104
1. INTRODUÇÃO	105
2. RESULTADOS.....	106
2.1 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM CAFEÍNA OU KW6002 SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS PELO ECI.....	106
2.1.1. <i>O ECI INDUZIU UM COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO NO TNF QUE FOI PREVENIDO PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM CAFEÍNA OU PELO ANTAGONISTA RECEPTORES A_{2A}, KW6002.</i>	106
2.1.2. <i>AUMENTO NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA INZUDIDO PELO ECI.</i>	108
2.1.3. <i>REDUÇÃO NO GANHO DE PESO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO ECI</i>	108
2.1.4. <i>O ECI INDUZIU UM AUMENTO NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE QUE NÃO FOI PREVENIDO PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM CAFEÍNA.</i>	110
2.1.5 <i>O TRATAMENTO CRÔNICO COM KW6002 PREVENIU O EFEITO ANSIOGÊNICO DO ECI.</i>	112
2.1.6. <i>O PREJUÍZO MNEMÔNICO INDUZIDO PELO ECI FOI PREVENIDO PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM CAFEÍNA</i>	114
2.1.7. <i>O PREJUÍZO MNEMÔNICO INDUZIDO PELO ECI FOI PREVENIDO PELO TRATAMENTO CRÔNICO COM KW6002</i>	116
2.1.8. <i>O ECI E O TRATAMENTO CRÔNICO COM CAFEÍNA OU KW6002 NÃO ALTERARAM A ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TESTE DO CAMPO ABERTO</i>	118
2.2. EFEITOS DO ECI E DO TRATAMENTO COM CAFEÍNA SOBRE PARÂMETROS DE NEURODEGENERAÇÃO E SINAPTOTOXICIDADE	120
2.2.1 <i>A EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS AO ECI NÃO CAUSOU MORTE NEURONAL.</i>	120
2.2.2 <i>EFEITO DO ECI E DO TRATAMENTO CRÔNICO COM CAFEÍNA SOBRE O CONTEÚDO DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS EM SINAPTOSSOMAS DE HIPOCAMPO</i>	121
2.2.3 <i>EFEITO DO ECI SOBRE A REATIVIDADE MICROGLIAL CARACTERIZADA PELA MARCAÇÃO COM CD11b</i>	123
2.2.4 <i>EFEITO DE ECI E DO TRATAMENTO COM CAFEÍNA SOBRE A REATIVIDADE ASTROCITÁRIA</i>	124
3 DISCUSSÃO	127
3.1 EFEITOS COMPORTAMENTAIS DO ECI E DO TRATAMENTO CRÔNICO COM CAFEÍNA OU KW6002 ..	127
3.1.1 <i>DEPRESSÃO.</i>	127
3.1.2. <i>PESO E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA.</i>	129
3.1.3 <i>ANSIEDADE.</i>	131
3.1.4. <i>MEMÓRIA.</i>	133
3.1.5. <i>ATIVIDADE LOCOMOTORA.</i>	135
3.2. EFEITOS DO ECI E DA INGESTÃO DE CAFEÍNA SOBRE A NEUROPLASTICIDADE HIPOCAMPAL	136
3.3.1 <i>DANO NEURONAL E SINAPTOTOXICIDADE</i>	136
3.3.2 <i>REATIVIDADE MICROGLIAL</i>	136
3.3.3. <i>REATIVIDADE ASTROCITÁRIA</i>	139
CONCLUSÕES	142
PERSPECTIVAS.....	144

RESUMO

A adenosina é um nucleosídeo endógeno que age como neuromodulador controlando sistemas de neurotransmissores intimamente envolvidos no estresse e na patofisiologia dos distúrbios de humor. A fim de contribuir para o entendimento das bases neurobiológicas da depressão e possivelmente para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, investigamos alguns dos possíveis mecanismos relacionados à manipulação aguda e crônica de receptores adenosinérgicos no teste do nado forçado (TNF) e no modelo de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível (ECI). A administração de adenosina (10 mg/kg, i.p.) ou dipiridamol (1-2 µg/sítio) reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TNF. Por outro lado, o tratamento com adenosina (5 ou 10 mg/kg, i.p.) por 14 dias não produziu um efeito antidepressivo no TNF. Na avaliação do mecanismo de ação antidepressiva da adenosina no TNF, investigamos a possível participação dos receptores NMDA, via da L-arginina-NO, canais de potássio (K^+) e dos sistemas serotoninérgico e opióide. O efeito da adenosina (10 mg/kg, i.p.) no TNF foi prevenido pelo pré-tratamento dos animais com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.), D-serina (30 µg/sítio, i.c.v.), L-arginina (750 mg/kg, i.p.), SNAP (25 µg/sítio, i.c.v.), sildenafil (5 mg/kg, i.p.), cromacalim (10 µg/site, i.c.v.), PCPA (100 mg/kg, i.p., 4 dias consecutivos), WAY100635 (0,1 and 0,3 mg/kg, s.c.), naloxona (1 mg/kg, i.p.), naltrindol (3 mg/kg, i.p.), clocinamox (1 mg/kg, i.p.) e DIPPA (1 mg/kg, i.p.), mas não com D-arginina (750 mg/kg, i.p.), cetanserina (5 mg/kg, i.p.) ou naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c.). Além disso, quando administrada em uma dose sub-ativa, a adenosina (1 mg/kg, i.p.) produziu um efeito sinérgico com MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.), cetamina (0,1 mg/kg, i.p.), cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.), L-NNA (0,3 mg/kg, i.p.), azul de metileno (9 -18 mg/kg, i.p.), ODQ (30 pmol/sítio, i.c.v.), TEA (25 pg/sítio, i.c.v.), glibenclamida (0,5 pg/sítio, i.c.v.), caribdotoxina (25 pg/sítio, i.c.v.), apamina (10 pg/sítio, i.c.v.), 8-OH-DPAT (1 mg/kg, i.p.), WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c.), morfina (1 mg/kg, s.c.), mas não com DOI (1 mg/kg, i.p.) ou cetanserina. Além disso, não foi observado efeito aditivo da administração combinada de doses ativas de morfina (5 mg/kg, s.c.) e adenosina (10 mg/kg, i.p.). Nossos resultados indicam que o efeito da adenosina no TNF é mediado, pelo menos em parte, por uma inibição de: receptores NMDA, síntese de óxido nítrico e cGMP, canais de K^+ e interação com os sistemas serotoninérgico e opióide. Com base no efeito diferencial da manipulação aguda e crônica de receptores de adenosina, em uma outra fase deste estudo, investigamos o efeito do tratamento crônico com um antagonista adenosinérgico, sobre as modificações neuroquímicas e comportamentais induzidas pelo ECI. O consumo crônico do antagonista não-seletivo de receptores de adenosina, cafeína (1g/l na água de beber, 4 semanas antes do ECI e durante o ECI) preveniu o comportamento tipo depressivo e o déficit de memória na tarefa do Labirinto em Y induzidos pelo ECI, sem afetar a atividade locomotora avaliada no campo aberto e o efeito ansiogênico do estresse no labirinto em cruz elevado. Além disso, o ECI causou uma redução na imunorreatividade da proteína de excitose SNAP-25 no hipocampo, um efeito que foi prevenido pela ingestão de cafeína. Esta também preveniu o aumento da imunorreatividade para GFAP nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Os resultados em conjunto mostram o envolvimento do sistema adenosinérgico na modulação do estresse e depressão. A administração aguda de adenosina produz um efeito antidepressivo no TNF, por interagir com múltiplos sistemas de neurotransmissores, mas não apresenta efeito no TNF quando administrada por 14 dias. Contudo, o tratamento crônico com um antagonista de receptores de adenosina confere neuroproteção contra algumas alterações neuroquímicas e comportamentais (incluindo o comportamento tipo-depressivo) induzidas pelo ECI.

Palavras chave: adenosina, estresse, depressão, serotonina, NMDA, cafeína

ABSTRACT

Adenosine is an endogenous nucleoside involved in the modulation of several neurotransmitter systems closely related to stress and mood disorders. In order to contribute to the understanding of the neurobiological pathways involved in depression and to the development of new therapeutical strategies for the treatment of this disease, this work investigated some of the mechanisms underlying the acute and chronic manipulation of adenosine receptors in the forced swimming test (FST) and in a model of depression induced by chronic unpredictable stress (CUS). The administration of adenosine (10 mg/kg, i.p.) or dipiridamol (1-2 µg/site, i.c.v.) reduced the immobility time in the FST. On the other hand, treatment for 14 days with adenosine (5 or 10 mg/kg, i.p.) did not produce any effect in the FST. In the experiments designed to investigate the mechanism of action responsible for the antidepressant-like effect of adenosine in the FST, the involvement of NMDA receptors, L-arginine-NO pathway, potassium (K⁺) channels and the serotonergic (5-HT) and opioid systems was assessed. The effect of adenosine was prevented by the pre-treatment of mice with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.), D-serine (30 µg/site, i.c.v.), L-arginine (750 mg/kg, i.p.), SNAP (25 µg/site, i.c.v.), sildenafil (5 mg/kg, i.p.), cromakalim (10 µg/site, i.c.v.), PCPA (100 mg/kg, i.p., four consecutive days), WAY100635 (0.1 and 0.3 mg/kg, s.c.), naloxone (1 mg/kg, i.p.), naltrindole (3 mg/kg, i.p.), clocinnamox (1 mg/kg, i.p.) and DIPPA (1 mg/kg, i.p.), but not with D-arginine (750 mg/kg, i.p.), ketanserin (5 mg/kg, i.p.) or naloxone methiodide (1 mg/kg, s.c.). In addition, a sub-effective dose of adenosine (1 mg/kg, i.p.) produced a synergistic antidepressant-like effect with MK-801 (0.001 mg/kg, i.p.), ketamine (0.1 mg/kg, i.p.), zinc chloride (5 mg/kg, i.p.), L-NNA (0.3 mg/kg, i.p.), methylene blue (18 mg/kg, i.p.), ODO (30 pmol/site, i.c.v.), TEA (25 µg/site, i.c.v.), glibenclamide (0.5 µg/site, i.c.v.), charybdotoxin (25 µg/site, i.c.v.), apamin (10 µg/site, i.c.v.), 8-OH-DPAT (1 mg/kg, i.p.), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.), morphine (1 mg/kg, s.c.), but not with DOI (1 mg/kg, i.p.) or ketanserin. In addition, no additive effect in the immobility time was observed when mice were treated with morphine (5 mg/kg, s.c.) plus adenosine (10 mg/kg, i.p.). Together the results indicate that the effect of adenosine in the FST appears to be mediated through an inhibition of NMDA receptors, NO and cGMP synthesis, inhibition of K⁺ channels and an interaction with 5-HT_{1A} receptors and opioid system. Focusing in the differential effects of acute versus chronic manipulation of adenosine receptors, in another phase of the study, we tested if chronic treatment with an adenosine receptor antagonist affords neuroprotection against neurochemical and behavioral modifications induced by CUS. Chronic caffeine consumption (1g/l in the drinking water starting 4 weeks before the CUS) prevented stress-induced alterations in the behavioral profile, such as depressive-like effect in the FST and memory deficits in the Y-maze test, without affecting locomotion in the open-field arena or the anxiogenic-like effect of CUS (elevated plus maze). In addition, CUS decreased the immunoreactivity of the synaptic proteins SNAP-25 in the hippocampus, an effect prevented by caffeine consumption. Caffeine was also able to prevent the CUS-induced increase in GFAP immunoreactivity of hippocampal CA1 and CA3 regions. These results support the notion that activation of adenosine receptors affords an antidepressant-like effect in the FST by interacting with multiple neurotransmitter systems. However, when adenosine was administered for 14 days no effect was observed. On the other hand, chronic treatment with the non-selective adenosine receptor antagonist, caffeine, confers a robust protection against neurochemical and behavioral alterations induced by CUS.

Key words: adenosine, stress, depression, serotonin, NMDA, caffeine

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Sintomas da depressão	17
Tabela 2. Protocolo do estresse crônico imprevisível	48
Tabela 3. Efeito do tratamento dos animais com inibidores de canais de K ⁺ no teste do campo aberto	75
Figura 1. Regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).....	21
Figura 2. Vias de formação da adenosina.....	28
Figura 3. Vias de sinalização ativadas pelos receptores de adenosina.....	30
Figura 4. Testes comportamentais.....	39
Figura 5. Injeção intracerebroventricular.....	41
Figura 6. Síntese de óxido nítrico (NO).....	60
Figura 7. Papel dos canais de K ⁺ na inibição dos neurônios 5-HT dos núcleos da rafe na ação de antidepressivos.....	62
Figura 8. Neurotransmissão serotoninérgica.....	66
Figura 9. Efeito da adenosina no TNF.....	69
Figura 10. Efeito da adenosina em potencializar a ação de doses sub-ativas de MK-801, cetamina ou cloreto de zinco no TNF. Efeito do NMDA ou da D-serina sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela adenosina ou MK-801 no TNF.....	70
Figura 11. Efeito da L-arginina, D-arginina ou SNAP na redução do tempo de imobilidade causada pela administração de adenosina no TNF.....	71
Figura 12. Efeito da administração de uma dose sub-ativa de adenosina combinada com doses sub-ativas de L-NNA, azul de metileno e ODQ no TNF.....	72
Figura 13. Efeito do pré-tratamento com sildenafil na redução do tempo de imobilidade causada pela administração de adenosina ou de ODQ no TNF.....	73
Figura 14. Efeito do tratamento com os bloqueadores de canais de K ⁺ , TEA, glibenclamida, apamina e caribdotoxina no TNF.....	74
Figura 15. Efeito dos bloqueadores de canais de K ⁺ , glibenclamida, apamina e caribdotoxina em potencializar a ação de doses sub-ativas de adenosina ou fluoxetina TNF.....	76
Figura 16. Efeito do pré-tratamento com cromacalim na redução do tempo de imobilidade causada pela adenosina ou fluoxetina no TNF.....	77
Figura 17. Efeito do pré-tratamento com L-arginina ou sildenafil na redução do tempo de imobilidade causada pelos bloqueadores de canais de K ⁺ , TEA, glibenclamida, apamina e caribdotoxina no TNF.....	78
Figura 18. Efeito do inibidor da síntese de 5-HT, PCPA na ação antidepressiva da adenosina e da fluoxetina no TNF.....	79
Figura 19. Efeito do pré-tratamento com diferentes doses de WAY100635 e adenosina no TNF.....	80
Figura 20. Efeito do pré-tratamento com 8-OH DPAT combinado com uma dose sub-ativa de adenosina no TNF.....	81

Figura 21. Efeito do pré-tratamento com cetanserina na ação antidepressiva da adenosina no TNF. Efeito do pré-tratamento com DOI ou cetanserina combinado com uma dose sub-ativa de adenosina no TNF	82
Figura 22. Efeito do pré-tratamento com DPCPX ou ZM241385 no efeito antidepressiva da fluoxetina no TNF.....	83
Figura 23. Efeito do pré-tratamento com naloxona e naloxona metiodida na redução do tempo de imobilidade causada pela adenosina no TNF.....	84
Figura 24. Efeito do pré-tratamento com naltrindol, clocinnamox ou DIPPA na redução do tempo de imobilidade causada pela adenosina no TNF.....	85
Figura 25. Efeito da administração de uma dose sub-ativa de adenosina combinada com uma dose sub-ativa de morfina no TNF (A). Efeito da administração combinada de adenosina e morfina em doses ativas no TNF	86
Figura 26. Mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo da adenosina no TNF...	103
Figura 27. O ECI causou um comportamento tipo depressivo no TNF que foi prevenido pelo tratamento com cafeína ou com KW6002.....	107
Figura 28. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína sobre os níveis plasmáticos de corticosterona.....	108
Figura 29. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína sobre o peso corporal dos animais.....	109
Figura 30. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína no labirinto em cruz elevado.....	111
Figura 31. Efeito do ECI e do tratamento com KW6002 no labirinto em cruz elevado.....	113
Figura 32. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína no teste do Labirinto em Y.....	115
Figura 33. Efeito do ECI e do tratamento com KW6002 no teste do Labirinto em Y.....	117
Figura 34. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína ou KW6002 sobre a atividade exploratória horizontal e vertical no teste do campo aberto.....	119
Figura 35. Efeito do ECI sobre a viabilidade celular.....	120
Figura 36. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína sobre o conteúdo da proteína sinápticas sinaptofisina	121
Figura 37. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína sobre o conteúdo da proteína sináptica SNAP-25.....	122
Figura 38. Efeito do ECI sobre a proliferação e ativação da microglia.....	123
Figura 39. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína sobre a densidade da proteína marcadora de astrócitos GFAP.....	124
Figura 40. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína sobre os níveis de GFAP nas porções CA1, CA3 e giro denteado (DG).....	126

LISTA DE ABREVIATURAS

AADC - descarboxilase de aminoácidos aromáticos
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
AD – adenilato ciclase
ADP - adenosina 5' - difosfato
AK – adenosina quinase
AMP - adenosina 5' - monofosfato
AMPc- adenosina 5' - monofosfato cíclico
ANOVA – análise de variância
ATP - adenosina 5' - trifosfato
AVP – arginina-vasopressina
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA - albumina de soro bovino
CaMKII – proteína quinase II dependente de cálcio e calmodulina
CRE – elemento de resposta ao AMPc
CREB – elemento de ligação de resposta ao AMP cíclico
DAG - diacilglicerol
DG – giro denteado
DIPPA - 2-(3,4-diclorofenil)-*N*-metil-*N*-[(1*S*)-1-(3-isotiocianatofenil)-2-(1-pirrolidinil)etil]acetamida
DMSO - dimetilsulfóxido
DOI - *R*(-)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropana HCl
DPCPX - 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina
ECI – estresse crônico imprevisível
CRH – hormônio liberador de corticotrofina
GABA - ácido gama aminobutírico
GFAP – proteína fibrilar ácida glial
GC – guanilato ciclase
GMP- guanosina 5' -monofosfato
HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC - cromatografia líquida de alta performance
5-HT – serotonina
5-HTP - 5-hidroxitriptofano
5-HTT – transportadores de serotonina
ISRN - inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina
ISRS - inibidor seletivo da recaptção de serotonina
i.c.v. - intracerebroventricular
i.p. - intraperitoneal
L-NNA - N^G-nitro-L-arginina
LPS - lipopolisacarídeo
MAO – monoamino oxidase
NA – noradrenalina
NaCl – cloreto de sódio
NAN-190 - 1-(2-metoxifenil)-4[-(2-phthalimido)butil]piperazina
NMDA - N-metil-D-aspartato
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
NT - neurotransmissores
NTPDase - nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase
ODQ - 1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona
8-OH-DPAT - (+)-8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino)tetralina

ONOO⁻ - peroxinitrito
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
PDE - fosfodiesterase
PCPA - p-clorofenilalanina metil éster
PIP3 - inositol 1,4,5-trifosfato
PKC - proteína quinase C
PKG – proteína quinase dependente de GMPc
PMSF - fenilmetilsulfonilo
PVN – núcleos paraventriculares do hipotálamo
PVD - difluoreto de polivinildieno
SAH - S-adenosilhomocisteína hidrolase
s.c. - subcutânea
SDS – dodecil sulfato de sódio
SNAP - S-nitroso-N-acetil-penicilamina
SNC - sistema nervoso central
TCA - antidepressivos tricíclicos
TEA – tetraetilamônio
TH - triptofano hidroxilase
TNF – teste do nado forçado
TNF α - fator de necrose tumoral- α
TSC – teste da suspensão da cauda
VOCCs – canais de Ca²⁺ sensíveis à voltagem
WAY100635 - N-{2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil}-N-(2-piridinil)ciclohexanocarboxamida
ZM241385 - 4-(2-[7-amino-2-{2-furil} {1,2,4} triazolo-{2,3-a} {1,3,5} triazin-5-il-amino]etil)fenol

Capítulo 1

Introdução Geral

1. Introdução

1.1. Depressão

Uma das primeiras menções históricas da melancolia surge da concepção grega dos humores de Hipócrates, dizendo que os distúrbios mentais estariam associados a um desequilíbrio de um dos quatro humores: o sangue, a linfa, a bile amarela e a bile negra. A melancolia seria causada pelo aumento da concentração de bile negra, do grego *melagkholía*: “*mélas, aína, an* ‘negro’ + *kolê, ês* ‘bile’”. Seus sintomas incluíam tristeza, ansiedade e tendência ao suicídio (Akiskal, 2000). Hoje, os distúrbios do humor são considerados doenças frequentes, severas e crônicas que incluem graves perturbações do estado emocional. Eles incluem os distúrbios unipolares, como a depressão maior e a distímia (um quadro mais brando e duradouro), e os transtornos bipolares, que alteram fases depressivas com fases maníacas (American Psychiatric Association, 1994).

O transtorno depressivo maior é uma das doenças neuropsiquiátricas mais frequentes no mundo ocidental, com aproximadamente 240 milhões de pessoas afetadas, o que reflete uma prevalência de 17% na população (Wong e Licinio, 2001; Nestler et al., 2002). Aproximadamente um a cada seis homens e uma a cada quatro mulheres vão passar por um episódio de depressão durante a vida (Wittchen et al., 1994).

Os distúrbios depressivos apresentam ainda uma alta taxa de recorrência. Após o primeiro episódio a chance de uma segunda manifestação aumenta em 50% e após dois episódios o risco sobe para 80% (American Psychiatric Association, 1994). Indivíduos com depressão maior têm, em média, cinco a nove episódios da doença durante a vida (Kessler et al., 1997; Kessler e Walters, 1998). Segundo a Organização Mundial de Saúde, nos anos 90, o transtorno depressivo maior representava a quarta causa de incapacitação entre adultos, contudo, espera-se que atinja o segundo lugar até 2020,

perdendo somente para as doenças isquêmicas (Murray et al., 1997). Todos estes fatores representam, além de um grande sofrimento pessoal e familiar um alto custo para o estado.

A depressão inclui sintomas psicológicos, comportamentais e somáticos, causa uma considerável morbidade psiquiátrica, perda da produtividade, além de ser o principal fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas, isquemia cerebral e de estar associada com outras condições clínicas como dor crônica, diabetes e doenças neurodegenerativas (Nemeroff e Owens, 2002; Bornstein et al., 2006; Lemke, 2008). Além disso, os índices de suicídio são cerca de vinte vezes maiores em pacientes deprimidos quando comparados à população geral (Harris e Barraclough, 1997). Os critérios para o diagnóstico da depressão são subjetivos e consistem basicamente na observação clínica dos sintomas, altamente variáveis e muitas vezes contrastantes (**Tabela 1**).

Tabela 1. Sintomas da depressão

Humor deprimido Anedonia
Falta de esperança, desespero, sentimento de culpa ou desvalia Perda de peso e apetite/ ganho de peso ou apetite Agitação psicomotora/ letargia Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio Dificuldade de concentração Insônia/ hipersônia
Sintomas associados
Ansiedade, disfunção sexual, déficit cognitivo, alterações no ritmo circadiano, dor.
Comorbidades mais comuns
Distúrbios de ansiedade (ansiedade generalizada, ataques de pânico) Abuso de substâncias, psicose; Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, isquemia; Diabetes, doenças cardiovasculares, osteoporose, hepatite, dor crônica.

Para um episódio de depressão maior ser reconhecido, o paciente precisa apresentar pelo menos um dos dois primeiros sintomas e pelo menos quatro dos outros sintomas por um período mínimo de duas semanas. Para revisão ver “ Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais” (American Psychiatric Association, 1994) (Adaptado de Millan, 2006).

1.2. Antidepressivos

As monoaminas tem sido relacionadas com o transtorno depressivo por mais de quatro décadas, no entanto esta relação começou empiricamente, com observações clínicas, que relataram que a iproniazida, fármaco utilizado no tratamento da tuberculose, produzia elevação de humor e euforia. Além disso, a reserpina, utilizada como anti-hipertensivo, tinha como um dos principais efeitos adversos o aparecimento de sintomas depressivos em cerca de 25% dos pacientes. Quase simultaneamente, a pesquisa de novos compostos anti-histamínicos conduziu ao aparecimento da imipramina (Snyder et al., 1996). Estes fármacos tinham em comum a capacidade de alterar os níveis sinápticos de monoaminas. Desta maneira, a hipótese monoaminérgica foi postulada para tentar explicar as bases neuroquímicas envolvidas na etiologia e no

tratamento dos distúrbios de humor. De acordo com a hipótese original, a depressão resultaria de uma deficiência de noradrenalina (NA) ou ainda de receptores ineficientes (Schildkraut, 1965). No entanto, a hipótese de Schildkraut (1965) relacionava apenas a NA, e mais tarde, foi reformulada por Coppen (1972) para incorporar também a serotonina (5-HT).

Os antidepressivos de primeira geração, tais como a tranilcipromina e a fenelzina, inibiam irreversivelmente a enzima monoamino oxidase (MAO), e os tricíclicos, tais como a imipramina, amitriptilina e clomipramina, inibiam a recaptação de NA e 5-HT, contudo eram associados a uma grande quantidade de efeitos adversos (Baldessarini, 1989; Millan et al., 2006). As gerações seguintes foram compostas por grupos heterogêneos de fármacos. Os inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (Ex: fluoxetina, paroxetina, sertralina) surgiram na década de 80 e revolucionaram a farmacoterapia dos transtornos psiquiátricos, pelos efeitos adversos reduzidos e pela capacidade de aliviar outros distúrbios associados a disfunções serotoninérgicas como ansiedade, obesidade, bulimia, agressão e distúrbios de estresse pós-traumático (Baldessarini, 1989; Millan et al., 2006). Além disso, surgiram inibidores seletivos da recaptação de NA (reboxetina), de 5-HT e NA em conjunto (venlafaxina), inibidores da recaptação de dopamina (bupropiona) e ainda antagonistas de receptores serotoninérgicos (mirtazapina, nefazodona) (Nelson, 1997).

A hipótese monoaminérgica é bastante simplista, e falha ao não explicar a ação de alguns antidepressivos que não agem no sistema monoaminérgico, ou ainda antidepressivos atípicos, como a tianeptina, que aumenta a recaptação de monoaminas (Brink et al., 2006). Além disso, existem fármacos que aumentam a concentração de monoaminas na fenda sináptica e não possuem propriedades antidepressivas, como a anfetamina. No entanto, o principal desafio na validação desta hipótese é a discrepância

temporal que existe entre os eventos bioquímicos envolvidos no metabolismo das monoaminas e os efeitos clínicos dos antidepressivos (Baldessarini, 1996).

Atualmente, vários estudos têm demonstrado que alterações na neuroplasticidade em áreas cerebrais como o hipocampo podem influenciar na predisposição e na recuperação dos sintomas da depressão (Dumman et al., 2006; Dumman e Monteggia, 2006; Manji et al., 2006). A neuroplasticidade engloba diferentes processos como a formação dendrítica, remodelação sináptica, desenvolvimento axonal, extensão neurítica, sinaptogênese e neurogênese, pelos quais o cérebro se adapta e responde a uma variedade de estímulos internos e externos. Estas observações resultaram na hipótese neurotrófica da depressão. Assim, a falta de fatores tróficos que promovam a neuroplasticidade foi relacionada como um possível mecanismo implicado na gênese dos sintomas da depressão, enquanto o reestabelecimento do suporte trófico tem sido associado ao desaparecimento destes sintomas após o tratamento, e pode explicar o efeito lento dos antidepressivos (Dumman et al., 2006; Dumman e Monteggia, 2006; Manji et al., 2006). No entanto, a hipótese monoaminérgica e a hipótese neurotrófica se complementam, e a diminuição na neuroplasticidade pode ser uma consequência de um declínio na atividade de neurotransmissores monoaminérgicos.

1.3. Depressão e estresse

Estudos apontam cerca de 25% de influência genética na manifestação dos transtornos depressivos, os outros 75% seriam o resultado de fatores ambientais (Henn e Vollmayr, 2004). A exposição a eventos estressantes durante a vida tem sido relacionada como o principal fator de risco na etiologia e progressão da depressão (Henn e Vollmayr, 2004; Chamey e Manji, 2004).

O estresse é um mecanismo de resposta que permite ao organismo reagir e adaptar-se frente a um estímulo nocivo ou potencialmente nocivo, mantendo assim sua homeostasia. Este estímulo pode ser tanto interno quanto externo, físico ou psicológico, e desencadeia uma ação orquestrada do organismo, que foi definida por Hans Selye como “síndrome geral de adaptação” (Szabo, 1985). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) corresponde ao sistema regulador primário de resposta ao estresse, capaz de integrar as funções neurológicas e estímulos sensoriais à função endócrina. Diante de um estímulo límbico e cortical, as células neurosecretoras dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na microcirculação hipofisária. Estes neurônios secretam também outros fatores, como arginina vasopressina (AVP), que atua sinergicamente com o CRH na ativação do eixo HPA. Na hipófise anterior, o CRH estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que age no córtex da glândula adrenal, promovendo a síntese de glicocorticóides.

Os glicocorticóides e as catecolaminas são as principais moléculas produzidas em resposta ao estresse, resposta esta que culmina com um aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca, ativação do sistema imunológico, aumento na mobilização das reservas energéticas e redução da atividade de outros sistemas menos importantes na resposta defensiva como o sistema reprodutor e o digestório (Kloet et al., 2005).

Os glicocorticóides adrenais modulam a atividade do eixo HPA, promovendo um estímulo inibitório sobre o hipocampo e hipotálamo, suprimindo a liberação de CRH e ACTH e terminando a resposta ao estresse uma vez que o estímulo estressor cessa (Swaab et al., 2005; Aguilera et al., 2007) (**Figura 1**). No entanto, quando os mecanismos de retroinibição mediados pelos glicocorticóides falham, a hiperreatividade prolongada do eixo HPA reflete um estado de resistência aos glicocorticóides freqüentemente visto em indivíduos com depressão (Swaab et al., 2005).

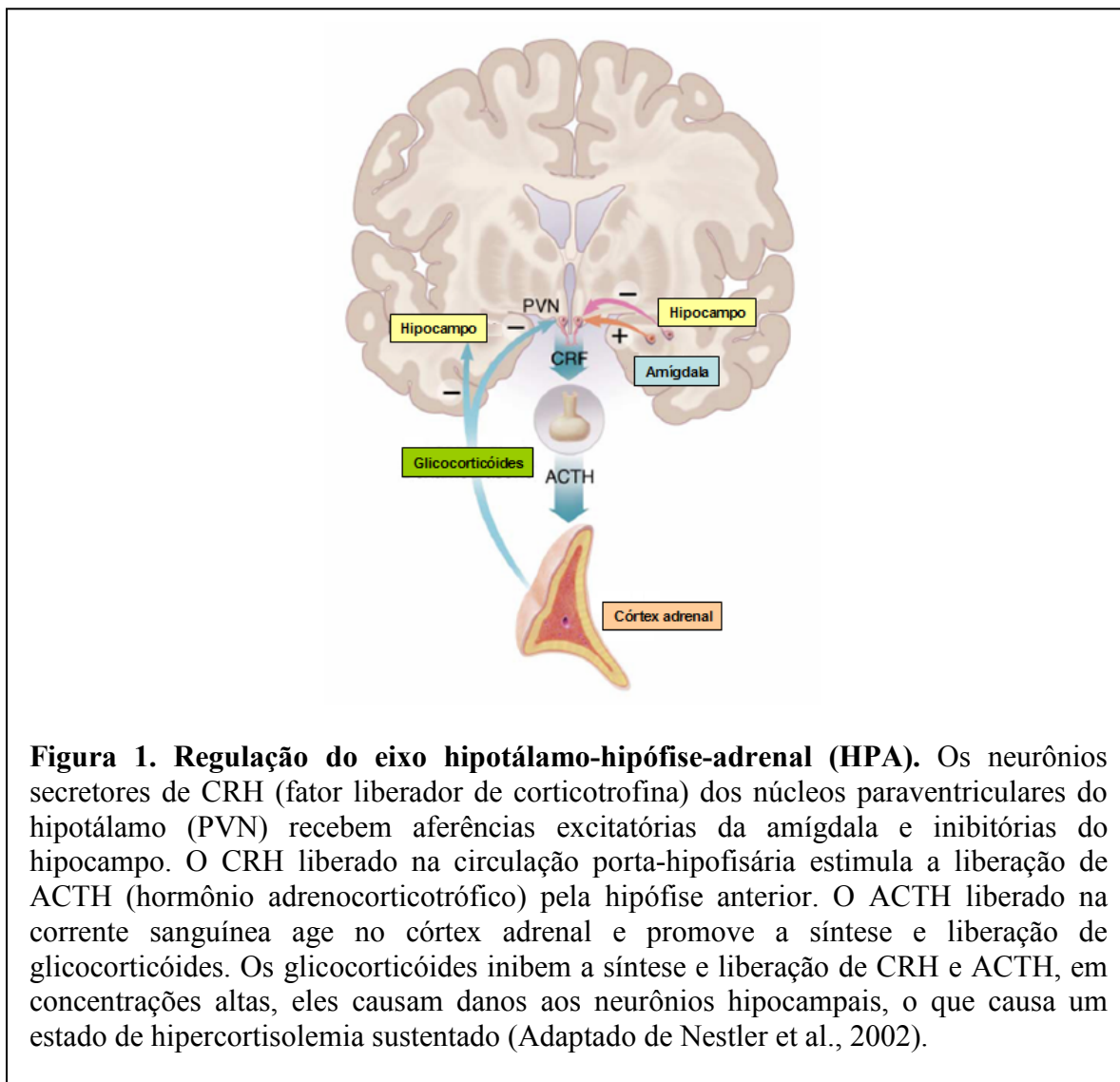


Figura 1. Regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Os neurônios secretores de CRH (fator liberador de corticotrofina) dos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVN) recebem aferências excitatórias da amígdala e inibitórias do hipocampo. O CRH liberado na circulação porta-hipofisária estimula a liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) pela hipófise anterior. O ACTH liberado na corrente sanguínea age no córtex adrenal e promove a síntese e liberação de glicocorticóides. Os glicocorticóides inibem a síntese e liberação de CRH e ACTH, em concentrações altas, eles causam danos aos neurônios hipocampais, o que causa um estado de hipercortisolemia sustentado (Adaptado de Nestler et al., 2002).

Pacientes deprimidos tendem a exibir um aumento nas glândulas adrenais e na hipófise, maiores níveis basais de cortisol e a falta de supressão do cortisol endógeno

após a administração de dexametasona, o que reflete a ausência do mecanismo de retroinibição (Gold et al., 1986, Musselman et al., 1998). Níveis elevados de CRH no líquor e nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos também foram encontrados em pacientes deprimidos (Nemeroff e Evans, 1984). Além disso, indivíduos portadores da síndrome de Cushing, caracterizada por um aumento nos níveis de glicocorticóides, ou ainda pacientes submetidos a terapia com glicocorticóides sintéticos desenvolvem sintomas psiquiátricos e cognitivos semelhantes aos observados em indivíduos com depressão (Brown e Suppes, 1998; Antonijevic e Steiger, 2003; Brown et al., 2004).

Outros estudos demonstram ainda que a redução na plasticidade dos circuitos neuronais e modificações morfológicas, sobretudo na arborização dendrítica, que ocorre na depressão, é mimetizada pela exposição ao estresse ou pelo tratamento crônico com corticosterona (Woolley et al., 1990; Maragiños e MsEwen, 1995; Maragiños et al., 1997). Várias classes de fármacos antidepressivos agem em substratos neuroendócrinos que regulam a secreção de cortisol (Pariante et al., 2001; 2003). Além disso, a utilização de inibidores da secreção de cortisol tem se mostrado efetiva para o tratamento da depressão em alguns estudos clínicos (Murphy et al., 1993; O'Dwyer et al., 1995; Belanoff et al., 2002).

1.4. Modelos animais

Os modelos animais são ferramentas amplamente utilizadas para compreensão dos mecanismos responsáveis pela etiologia e tratamento de doenças. Estes modelos sofrem com algumas restrições inerentes ao fato de não se poder reproduzir fidedignamente algumas características dos transtornos humanos, como o sentimento de culpa, pensamento de morte e suicídio. No entanto, são responsáveis, em grande parte, pelo desenvolvimento das hipóteses que relacionam as possíveis bases biológicas dos

transtornos mentais e pelo que se sabe atualmente sobre as ações dos psicofármacos em diversas etapas dos processos de neurotransmissão.

Embora seja impossível recriar todos os aspectos de uma determinada doença, especialmente aquelas que envolvem condições complexas e multifatoriais como as doenças psiquiátricas, estes modelos mimetizam um ou alguns dos sintomas associados à doença ou são sensíveis aos fármacos utilizados clinicamente. Desta maneira, é possível se estabelecer um paralelo entre os efeitos comportamentais induzidos pelos fármacos com os sinais clínicos ou neurofisiológicos em humanos, visando contribuir para a elucidação das bases etiológicas das várias doenças mentais.

Modelos com validade preditiva estão entre os mais utilizados para seleção de novos fármacos antidepressivos, são de fácil uso e de boa reprodutibilidade (Cryan et al., 2002; Nestler et al., 2002a,b). Entre eles, podemos destacar o teste do nado forçado (TNF) e o teste de suspensão da cauda (TSC) (Nestler et al., 2002a,b). Estes modelos são assim designados por serem baseados exclusivamente no efeito comportamental dos fármacos utilizados clinicamente, contudo não mimetizam sintomas ou bases neurobiológicas da doença.

No entanto, outros modelos animais para depressão apresentam validade fenomenológica além da validade preditiva. Isto é, além de serem sensíveis aos fármacos utilizados clinicamente, mimetizam em animais sintomas ou efeitos neurobiológicos associados à doença. Entre eles, pode-se destacar a bulbectomia olfatória, o modelo do desamparo aprendido, a separação materna, o isolamento social (McArthur e Borsini, 2006) e o estresse crônico (McArthur e Borsini, 2006). Os modelos de indução ao estresse baseiam-se na exposição do animal a uma variedade de situações de estresse ambiental e, desta forma, na indução de um comportamento do tipo depressivo (McArthur e Borsini, 2006). Entre estes modelos, encontram-se o

estresse crônico moderado (Willner, 2005), derrota social (Nestler et al., 2002a) e estresse imprevisível (Lu et al., 2006). Em geral, animais submetidos a estes modelos apresentam alterações fisiológicas fortemente relacionadas aos sintomas da depressão em humanos (Casarotto e Andreatini, 2007).

O estresse crônico imprevisível (ECI) é um dos modelos que melhor mimetiza as principais causas da depressão em humanos. A exposição crônica de roedores a diferentes agentes estressores, tanto físicos quanto psicológicos, induz uma série de alterações fisiológicas e comportamentais, tais como: anedonia, diminuição da latência e aumento na quantidade de sono REM (Moreau et al., 1995); diminuição no comportamento exploratório e sexual (D'Aquila et al., 1994); aumento da secreção de corticosterona (Kubera et al., 2001; Joels et al., 2004); aumento da transmissão glutamatérgica no giro denteado; aumento na expressão de canais de cálcio; apoptose e diminuição da neurogênese hipocampal (Joels et al., 2004). A relevância deste modelo é evidenciada tendo em vista que os déficits no sistema de motivação e recompensa e nos demais parâmetros comportamentais são revertidos pelo tratamento crônico com antidepressivos de todas as classes (Willner et al., 1992; D'Aquila, 1994; Willner et al., 1997). Todos esses parâmetros fisiológicos e comportamentais garantem ao modelo uma alta validade preditiva e fenomenológica, especialmente quando comparado aos modelos agudos de estresse (Katz et al., 1981; Willner et al., 1987).

2. Sistema adenosinérgico

2.1. Perspectiva histórica

Tanto as bases púricas quanto os nucleotídeos e seus nucleosídeos derivados têm uma ampla distribuição nas células animais e participam em diferentes processos fisiológicos como a contração muscular, neurotransmissão, resposta imunológica,

inflamação, nocicepção, modulação da função cardíaca, entre outras. Os primeiros trabalhos relatando as atividades biológicas de compostos purinérgicos surgiram no final da década de 20, com Drury e Szent-Gyorgyi (1929). Foi demonstrado que a administração intravenosa de extratos de tecido cardíaco em mamíferos causava uma bradicardia transitória, vasodilatação e uma diminuição na pressão arterial, efeito atribuído à adenosina 5'-monofosfato (AMP) e adenosina. No entanto, após anos de pesquisa relacionando os efeitos das purinas na modulação da função cardíaca, foi somente na década de 50 com os trabalhos de estimulação do nervo auricular de coelhos, que Holton e colaboradores sugeriram um papel para um nucleotídeo purinérgico, a adenosina 5'-trifosfato (ATP), na neurotransmissão (Holton e Holton, 1953). Esta hipótese foi confirmada mais tarde por Burnstock (1970), que propôs ainda que receptores extracelulares específicos estariam mediando as ações fisiológicas do ATP e da adenosina (Burnstock, 1978). Nos anos 90, a clonagem de pelo menos 17 subtipos de receptores purinérgicos amplamente distribuídos em uma grande variedade de tecidos gerou um aumento no interesse, e assim, o entendimento das suas ações tanto em condições fisiológicas quanto patológicas evoluiu substancialmente.

A adenosina é um nucleosídeo derivado da purina abundante em todas as células, onde participa de vias metabólicas essenciais como o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos, metabolismo de aminoácidos, reações de transmetilação e metabolismo da amônia (Cunha et al., 2005). Ela é liberada das células em situações de aumento da atividade metabólica ou em situações de hipóxia ou hipoglicemia, onde ocorre um desequilíbrio energético, servindo como um sinal de controle homeostático essencial para o equilíbrio do metabolismo da maioria dos tecidos, em particular no cérebro (Cunha, 2001). A concentração intracelular de adenosina é cerca de 10-50 nM em condições basais, podendo atingir a ordem de micromolar em condições de estresse

metabólico. Nestas situações, a adenosina liberada tem um efeito inibitório sobre as células vizinhas, reduzindo sua atividade e assim o gasto energético (Latini e Pedata 2001).

Além de atuar como um importante sinal homeostático, a adenosina também desempenha um papel neuromodulatório a nível sináptico, regulando a liberação de neurotransmissores, a resposta pós-sináptica e a ação de outros receptores (Cunha, 2001). Sendo assim, a adenosina não corresponde a um neurotransmissor clássico, uma vez que não existem evidências de um armazenamento vesicular, tampouco de uma liberação dependente de cálcio (Hack e Christie, 2003). As concentrações basais deste nucleosídeo são dependentes do equilíbrio entre múltiplos mecanismos que regulam sua produção, liberação, recaptção e metabolismo (Latini e Pedata, 2001).

2.2. Formação e metabolismo

A formação de adenosina pode ocorrer tanto dentro, quanto fora das células, e depende principalmente da atividade de enzimas denominadas nucleotidases. Dentro deste grupo de enzimas, podemos destacar a família das NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), que são capazes de promover a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e difosfatados até nucleotídeos monofosfatados. Por sua vez, a hidrólise de nucleotídeos monofosfatados, como o AMP, aos seus respectivos nucleosídeos é catalisada pela enzima 5'-nucleotidase (Zimmermann e Braun, 1999) (**Figura 2**). A taxa de formação de adenosina a partir da 5'-nucleotidase é dependente das concentrações de AMP, e um fator importante na regulação desta via é o nível energético da célula. A adenosina pode ser formada ainda por uma via alternativa que compreende a clivagem da S-adenosilhomocisteína pela enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase (SAH). Esta

reação ocorre no meio intracelular e o equilíbrio é dependente das concentrações de S-adenosil homocisteína, adenosina e homocisteína (Lloyd et al., 1993).

A adenosina é liberada ou recaptada de todas as células através de transportadores de nucleosídeos. Os principais transportadores são equilibrativos, apresentam uma maior afinidade pela adenosina (são sensíveis a concentrações na ordem de 100 μM), e a direção do transporte é dependente do gradiente de concentração nos dois lados da membrana. Estes transportadores são abundantes no SNC, tanto em neurônios quanto em astrócitos (Alanko et al., 2006). Existem também transportadores que levam adenosina e nucleotídeos do exterior para o interior das células, utilizando um gradiente de Na^{+2} como força motriz (transportadores de concentração). No entanto, eles são de baixa afinidade e apesar de expressos em vários tecidos incluindo o cérebro, seu papel fisiológico não está bem elucidado (Anderson et al., 1996).

A adenosina formada pode ser novamente fosforilada pela enzima adenosina quinase e convertida em AMP. Este processo é essencialmente intracelular, no entanto a adenosina desaminase também é encontrada associada às membranas celulares (Brundege e Dunwiddie, 1997; Ralevic e Burnstock, 1998). O processo de metabolização da adenosina compreende a formação de inosina por ação da enzima adenosina desaminase. Esta enzima está presente essencialmente no meio intracelular, e é preferencialmente ativada quando as concentrações de adenosina atingem níveis muito altos (Fredholm e Lerner, 1982) (**Figura 2**).

Toda esta cascata enzimática regula a disponibilidade de ligantes (ATP, ADP, AMP e adenosina) desempenhando uma função essencial na neurotransmissão purinérgica, controlando a disponibilidade e os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares e, conseqüentemente a ativação dos receptores purinérgicos (Zimmermann, 2000).

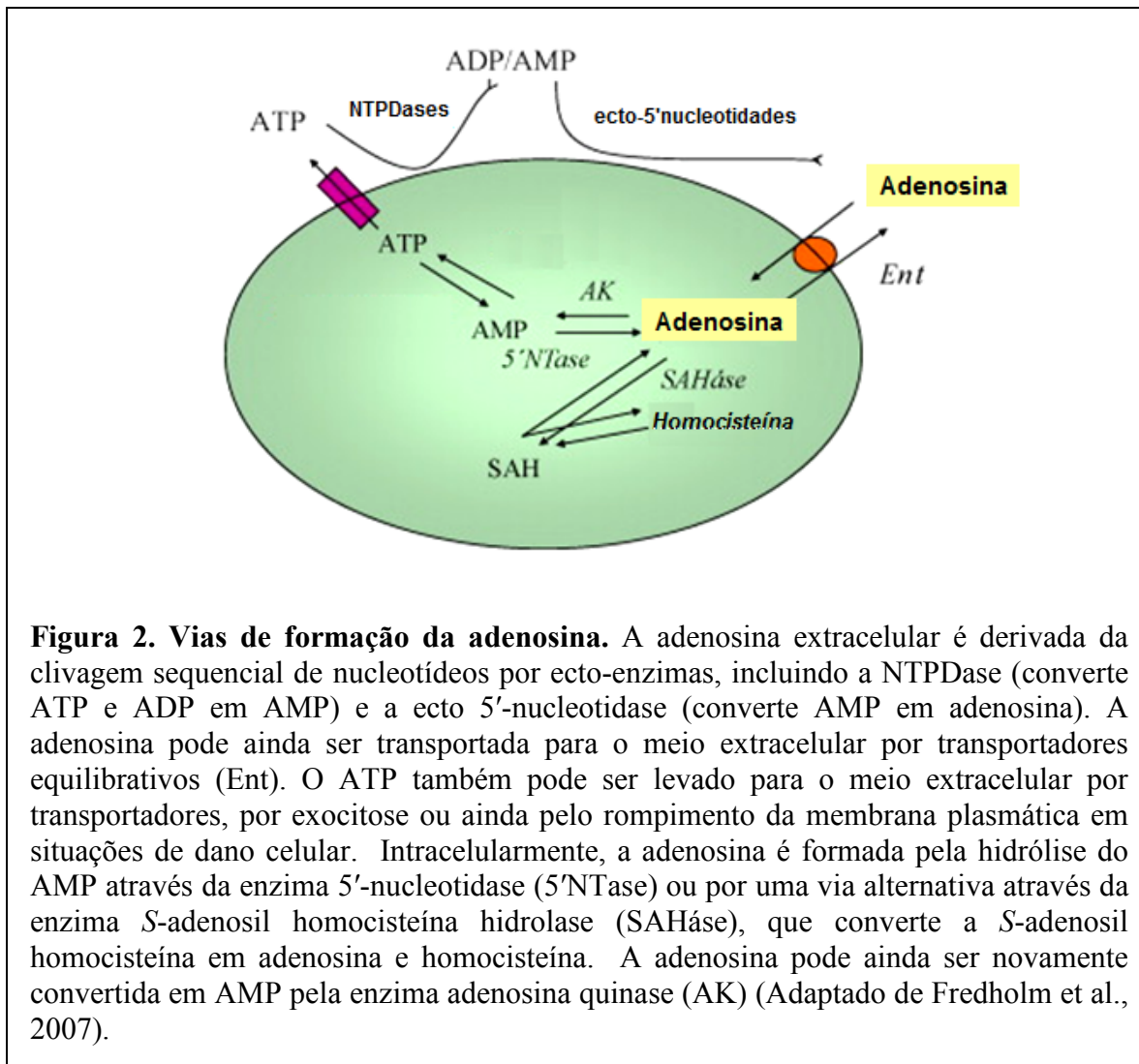


Figura 2. Vias de formação da adenosina. A adenosina extracelular é derivada da clivagem sequencial de nucleotídeos por ecto-enzimas, incluindo a NTPDase (converte ATP e ADP em AMP) e a ecto 5'-nucleotidase (converte AMP em adenosina). A adenosina pode ainda ser transportada para o meio extracelular por transportadores equilibrativos (Ent). O ATP também pode ser levado para o meio extracelular por transportadores, por exocitose ou ainda pelo rompimento da membrana plasmática em situações de dano celular. Intracelularmente, a adenosina é formada pela hidrólise do AMP através da enzima 5'-nucleotidase (5'NTase) ou por uma via alternativa através da enzima S-adenosil homocisteína hidrolase (SAHÁse), que converte a S-adenosil homocisteína em adenosina e homocisteína. A adenosina pode ainda ser novamente convertida em AMP pela enzima adenosina quinase (AK) (Adaptado de Fredholm et al., 2007).

2.3. Receptores de adenosina

As ações biológicas da adenosina são mediadas por sua interação com seus receptores. Foram identificados quatro subtipos de receptores, todos glicoproteínas com sete domínios transmembrana acoplados a proteínas G, nomeados: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Fredholm et al., 2001; Ribeiro et al., 2003). A afinidade da adenosina pelos receptores, determinada experimentalmente (EC₅₀ = A₁, 0,31 μM; A_{2A}, 0,7 μM; A_{2B}, 24 μM; A₃, 0,29 μM), demonstra que os receptores A₁, A_{2A} e A₃ podem ser ativados por concentrações fisiológicas de adenosina, enquanto concentrações fisiopatológicas são necessárias para a ativação do receptor A_{2B} (Fredholm et al., 2001).

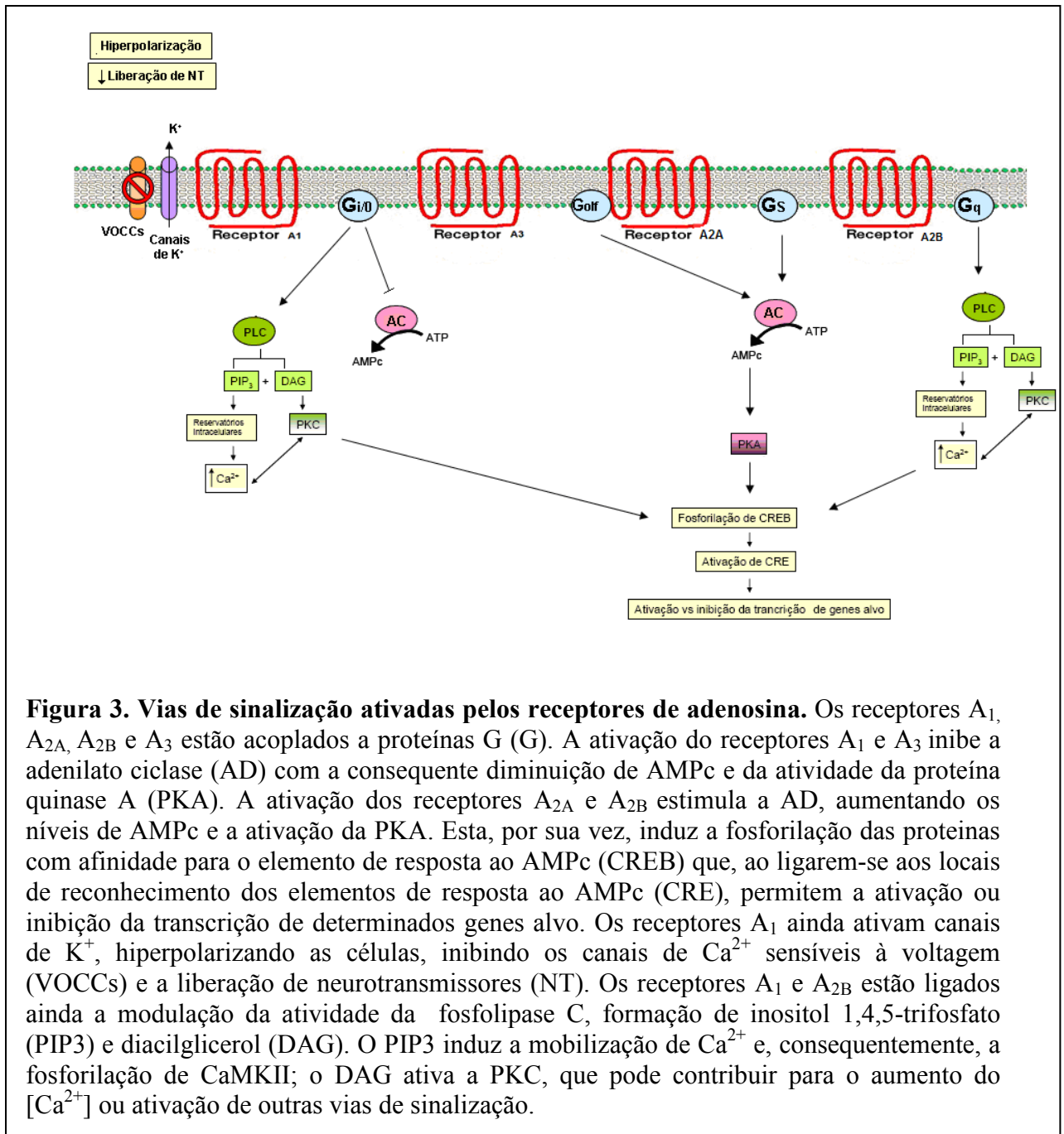
Os receptores A_1 são os mais abundantes no SNC, estão localizados principalmente no córtex e sistema límbico, mas também são encontrados em outras regiões como núcleos da base, cerebelo, núcleos da rafe, diencéfalo e tronco cerebral (Fastbom et al., 1987). Estes receptores são mais abundantes em neurônios, especialmente nas sinapses, tanto pré- quanto pós-sinápticamente (Tetzlaff et al., 1987). O mecanismo de sinalização operado pelos receptores A_1 é mediado por proteínas $G_{i/o}$, inibição da adenilato ciclase e aumento da atividade da fosfolipase C. No sistema nervoso, estão relacionados à ativação de canais de K^+ pré-sinápticos e inibição do influxo de cálcio, diminuindo a excitabilidade neuronal, a atividade sináptica e a liberação de vários neurotransmissores, tais como dopamina, glutamato, 5-HT, NA e acetilcolina (Pan et al., 1995; Scholz e Miller, 1996).

Os receptores A_{2A} estão amplamente distribuídos por tecidos periféricos e também no SNC (Lee et al., 2003). Centralmente, estão presentes principalmente no estriado, núcleo acumbens e tubérculo olfatório. No entanto, também estão presentes em outras áreas do encéfalo, incluindo o córtex e sistema límbico (Cunha et al., 1994; Svenningsson et al., 1999; Lopes et al., 2002; Rebola et al., 2002; 2003). As ações destes receptores são mediadas pela ativação de proteínas G estimulatórias G_s e G_{olf} , ativação da adenilato ciclase e aumento nos níveis de AMPc.

Os receptores A_{2B} estão acoplados a proteína G_s e G_q , aumentando os níveis de AMPc e a atividade da fosfolipase C, mas possuem uma baixa expressão no SNC. Os receptores A_3 foram os últimos receptores adenosinérgicos descritos e eles estão principalmente acoplados a uma proteína G_i , sendo expressos de forma moderada no cerebelo e hipocampo (Fredholm et al., 2003).

Os receptores A_{2B} e A_3 são menos abundantes no SNC e a falta de ligantes seletivos faz com que eles sejam menos estudados (Cunha et al., 2005). Assim, o papel da

adenosina no SNC é freqüentemente considerado como mediado pelo balanço entre a ativação de receptores A_1 e A_{2A} (Figura 3).



2.4. Efeitos agudos e crônicos

Tem sido demonstrado que o tratamento por longos períodos com antagonistas de receptores A_1 e A_{2A} tem o mesmo efeito do tratamento agudo com seus agonistas. Isso é particularmente evidenciado em situações de isquemia, convulsão e processos

cognitivos (Jacobsen et al., 1996). Ao contrário dos efeitos protetores da administração aguda de agonistas A_1 , o tratamento crônico reduz a sobrevivência neuronal e agrava o dano gerado pela isquemia (revisado por Von Lubitz et al., 1995). Efeitos similares já foram relatados para modelos animais de convulsão, onde o efeito protetor de agonistas de receptores A_1 é perdido após tratamento crônico (Von Lubitz et al., 1994; Adami et al., 1995).

Os efeitos induzidos pela administração repetida de agonistas A_1 é freqüentemente acompanhado de dessensibilização, o que não acontece com os receptores A_{2A} (Adami et al., 1995). Assim, a modulação dos receptores de adenosina pode apresentar funções opostas e com importância distinta em situações agudas e crônicas (Cunha, 2005).

2.5. Sistema adenosinérgico na modulação do estresse e depressão

A adenosina está envolvida na regulação de mecanismos centrais importantes como memória e cognição, regulação do ciclo sono-vigília, ansiedade e nocicepção (Ribeiro et al., 2003). No entanto, também existem evidências relacionando um papel para o sistema adenosinérgico na etiologia e tratamento de algumas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, como a doença de Parkinson, de Huntington e a esquizofrenia (Blum et al., 2003; Simola et al., 2006; Lara et al., 2006) Além disso, o envolvimento da adenosina na modulação do humor tem sido demonstrado, tanto em estudos clínicos quanto pré-clínicos (Revisado por Cunha et al., 2008).

Ao longo dos anos, várias evidências têm reforçado a existência de um papel relevante do sistema adenosinérgico na etiopatologia da depressão. Elgün e colaboradores (1999) demonstraram que a atividade da adenosina desaminase, enzima que converte a adenosina em inosina, está reduzida no soro de pacientes com depressão maior, e relataram ainda a existência de uma correlação inversa entre a atividade desta

enzima e a severidade da depressão. Além disso, tanto a privação de sono quanto a terapia eletroconvulsiva, duas medidas terapêuticas efetivas no tratamento dos distúrbios do humor, estão associadas com um aumento na liberação de adenosina e na expressão de receptores A₁ (Van Calker e Biber, 2005).

Alguns estudos têm sugerido que o aumento nos níveis de adenosina pode estar relacionado a um efeito antidepressivo. Em modelos *in vitro* ou *ex vivo*, foi demonstrado que antidepressivos tricíclicos como a nortriptilina, clomipramina e desipramina aumentam a liberação de adenosina em neurônios corticais (Phillis et al., 1982; 1984), sugerindo que o aumento nos níveis de adenosina podem estar relacionado a um efeito antidepressivo. Também foi demonstrado que as NTPDases e a 5'-nucleotidase são enzimas sensíveis à ação de diferentes fármacos antidepressivos tanto na sua atividade quanto no padrão de expressão, o que sugere que estes fármacos podem atuar modulando os níveis sinápticos de ATP e adenosina (Pedrazza et al., 2008).

O papel da adenosina na depressão está de acordo com a capacidade do sistema adenosinérgico atuar como controlador de vários sistemas com papel chave na etiopatologia da depressão como a liberação de 5-HT (Okada et al., 2001), a liberação de corticotrofina e cortisol/corticosterona (Scaccianoce et al., 1989; Chau et al., 1999; Nicholson et al., 1989; Chen et al., 2008) e modular a excitabilidade neuronal no hipocampo (Fredholm et al., 2005), uma região chave no controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Em concordância com a hipótese que a adenosina exerce uma ação antidepressiva, o nosso grupo demonstrou que a administração de adenosina produz efeito antidepressivo no TNF e TSC em camundongos, por um mecanismo que envolve a ativação de receptores A₁ e A_{2A} (Kaster et al., 2004).

No entanto, também existe uma série de trabalhos sugerindo um papel depressogênico para a adenosina. Em modelos animais, foi inicialmente demonstrado

que a administração de altas doses (100 mg/kg) de adenosina produz um efeito depressogênico no TNF, que foi prevenido pela administração de cafeína, antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos (Kulkarni et al., 1985). Outros estudos descrevem um envolvimento dos receptores A_{2A} na modulação do humor, uma vez que tanto animais com depleção genética dos receptores A_{2A} quanto a administração de antagonistas destes receptores produzem um efeito antidepressivo no TNF. A administração aguda de cafeína também já foi relacionada a um efeito antidepressivo no TNF (Sarges et al., 1990; El Yacoubi et al., 2001; 2003). Estes resultados poderiam sugerir que a adenosina induz um estado de desespero comportamental, contudo, as doses utilizadas tanto de cafeína quanto de outros antagonistas de receptores de adenosina aumentam a atividade locomotora dos animais, deixando a possibilidade do efeito observado no TNF não ser específico (Williams, 1989; Sarges et al., 1990; El Yacoubi et al., 2001; 2003; Rodrigues et al., 2005). Além disso, a administração aguda de cafeína em doses que não alteram a atividade locomotora não apresenta efeito antidepressivo no TNF (Sarges et al., 1990; Enríquez-Castillo et al., 2008).

Cunha e colaboradores (2006) demonstraram que animais submetidos ao estresse de imobilização sub-crônico apresentaram uma redução na densidade de receptores A_1 e um aumento na densidade de receptores A_{2A} no hipocampo (Cunha et al., 2006). Adicionalmente, o tratamento com um antagonista de receptores A_{2A} foi efetivo em prevenir a redução da densidade sináptica induzida pelo estresse, sugerindo o envolvimento do sistema adenosinérgico na modulação dos efeitos associados ao estresse (Cunha et al., 2006).

Esta conjunção de efeitos pró e antidepressivos associados ao sistema adenosinérgico não é surpreendente se considerarmos a existência de dois grupos de receptores de adenosina com funções opostas e com importância distinta em situações

agudas e crônicas (Cunha, 2005). Desta maneira, torna-se relevante avaliar a modulação exercida pelo sistema adenosinérgico em modelos animais de estresse crônico e depressão, distinguindo claramente os possíveis sistemas de neurotransmissão envolvidos e a duração da manipulação experimental imposta. Sem considerarmos estes dois parâmetros não é possível definir a função do sistema adenosinérgico, que como sistema homeostático por excelência pode desempenhar um papel essencial no controle do estresse crônico e depressão.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é estudar o efeito do sistema adenosinérgico em modelos de estresse agudo e crônico, como o TNF e o modelo de depressão induzida pelo ECI. Investigando os mecanismos de ação responsáveis pelo efeito da administração aguda de adenosina no TNF, além dos efeitos comportamentais, bioquímicos e morfológicos, induzidos pelo tratamento crônico com cafeína, antagonista preferencial de receptores A_{2A} , no modelo de depressão induzida pelo ECI.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Investigar a possível participação dos sistemas glutamatérgico (receptores NMDA), da via da L-arginina-NO, bem como dos canais de K^+ e dos sistemas serotoninérgico e opióide no efeito antidepressivo da adenosina no TNF
- 2) Investigar os efeitos comportamentais de animais submetidos ao modelo de depressão induzida pelo ECI no TNF, teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e labirinto em Y, bem como o efeito do tratamento crônico com cafeína (antagonista preferencial de receptores A_{2A}) ou KW6002 (antagonista seletivo de receptores A_{2A} , sobre estes parâmetros.
- 3) Investigar efeitos bioquímicos e morfológicos como densidade de proteínas sinápticas, morte neuronal, proliferação de astrócitos e células da microglia nos animais submetidos ao ECI, bem como o efeito do tratamento crônico com cafeína.

Capítulo 2

Material e Métodos

1. Testes comportamentais

Alguns cuidados básicos foram sempre utilizados nos testes comportamentais descritos a seguir (**Figura 4**), como a aclimação do animais na sala de comportamento no mínimo 2 horas antes do início dos testes, limpeza dos aparatos com álcool 10% entre cada sessão ou mudança da água no caso do TNF.

1.1. Teste do Nado Forçado (TNF)

O TNF é um dos modelos comportamentais mais utilizados para detectar atividade antidepressiva de fármacos. O método original foi descrito por Porsolt (1977) e baseia-se na observação de que quando os animais são submetidos a uma situação onde não há possibilidade de escape, após um período de agitação inicial eles adotam uma postura de imobilidade. O camundongo é considerado imóvel quando flutua ou faz apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. O tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 minutos em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A redução no tempo de imobilidade é o efeito observado após a administração aguda de várias classes de fármacos antidepressivos (Porsolt et al., 1977), já o aumento deste tempo caracterizara um estado “depressivo” dos animais ou um efeito depressogênico de fármacos.

1.2. Teste do Campo Aberto

Este modelo foi proposto por Hall (1936) para a avaliação da atividade locomotora dos animais. O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes

cruzados em um período de 6 minutos é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. O teste é feito em uma sala acusticamente isolada e com baixa luminosidade. Como fármacos que apresentam um efeito psicoestimulante podem representar um resultado “falso positivo” no TNF, o teste do campo aberto é imprescindível para se determinar a especificidade do efeito antidepressivo.

1.3. Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado foi um modelo proposto por Lister (1987), baseado na avaliação do medo inato dos roedores a lugares altos e espaços abertos. O aparato consiste em dois braços abertos (50 X 10 cm), com bordas de 1 cm de altura e dois braços fechados de dimensões iguais porém com paredes de 40 cm de altura, unidos por uma plataforma central de 10 cm² e dispostos de forma que braços iguais ficam opostos entre si. O aparato é elevado 50 cm do chão e colocado em uma sala acusticamente isolada e com iluminação vermelha. O animal é colocado no centro da plataforma virado para um dos braços abertos, os comportamentos avaliados são: o número de entradas (com as 4 patas) e o tempo de permanência nos braços abertos, o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados, durante 5 minutos. Observou-se que fármacos ansiolíticos, incluindo os benzodiazepínicos, barbitúricos e etanol, aumentam o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que agentes ansiogênicos produzem um efeito oposto.

1.4. Labirinto em Y

O teste do Labirinto em Y é utilizado para a avaliação da memória de trabalho de roedores, através da análise do número de alternâncias espontâneas do animal em uma única sessão de teste. O labirinto consiste em três braços iguais dispostos na forma

de um Y. O animal é colocado na ponta de um dos braços e move-se livremente por todo aparato durante 8 minutos. O número de alternâncias espontâneas é definido como o número de entradas sucessivas nos três braços sem repetições, e representa um indicativo de memória. A porcentagem de alternância é calculada pelo número total de acertos dividido pelo número total de entradas em qualquer braço menos dois e multiplicado por 100 (Dellu et al., 1992).

Alternativamente foi feito o teste do Labirinto em Y modificado, onde os animais são expostos a duas sessões no aparato. Na primeira, exploram o labirinto por 5 minutos com um dos braços bloqueados. Após um intervalo de 2 horas, os animais são novamente colocados no labirinto e o tempo de exploração do braço novo (braço que estava fechado anteriormente) é contado por um período de 8 minutos. Os roedores tendem a explorar por mais tempo o braço novo, e este é o indicativo de memória avaliado.

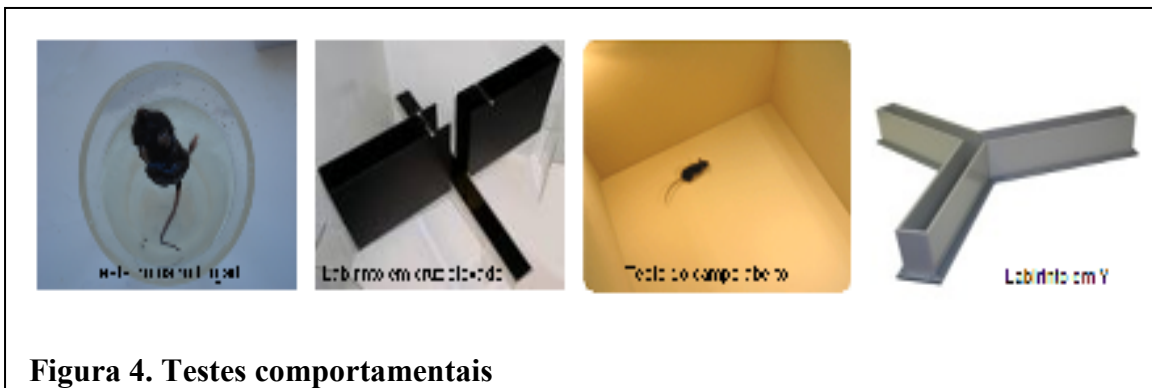


Figura 4. Testes comportamentais

2. Avaliação do mecanismo de ação antidepressiva da adenosina no TNF

Para a investigação do mecanismo de ação antidepressiva da adenosina foram utilizados camundongos *Swiss* adultos de ambos os sexos, pesando entre 35 e 45g e

mantidos a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 horas (7:00-19:00 h). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no biotério setorial nas mesmas condições. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA).

2.1. Vias de administração dos compostos

Os compostos utilizados foram administrados pelas vias intraperitoneal (i.p.) e subcutânea (s.c.) em um volume de 10 ml/kg, ou ainda pela via intracerebroventricular (i.c.v.), em um volume constante de 5 μl /camundongo. Para administração i.c.v. os animais foram anestesiados com éter e a técnica foi realizada conforme a descrição de Laursen e Belknap (1986) com pequenas modificações. Foi utilizada uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25 μl . A agulha foi inserida perpendicularmente no crânio, diretamente no ventrículo lateral, utilizando-se referências anatômicas externas como uma linha imaginária mediana antero-posterior (correspondente à sutura mediana) e uma uma linha imaginária traçada na base dos olhos (**Figura 5**). A fim de se verificar o local exato da injeção, os animais foram dissecados e analisados macroscopicamente após os testes.

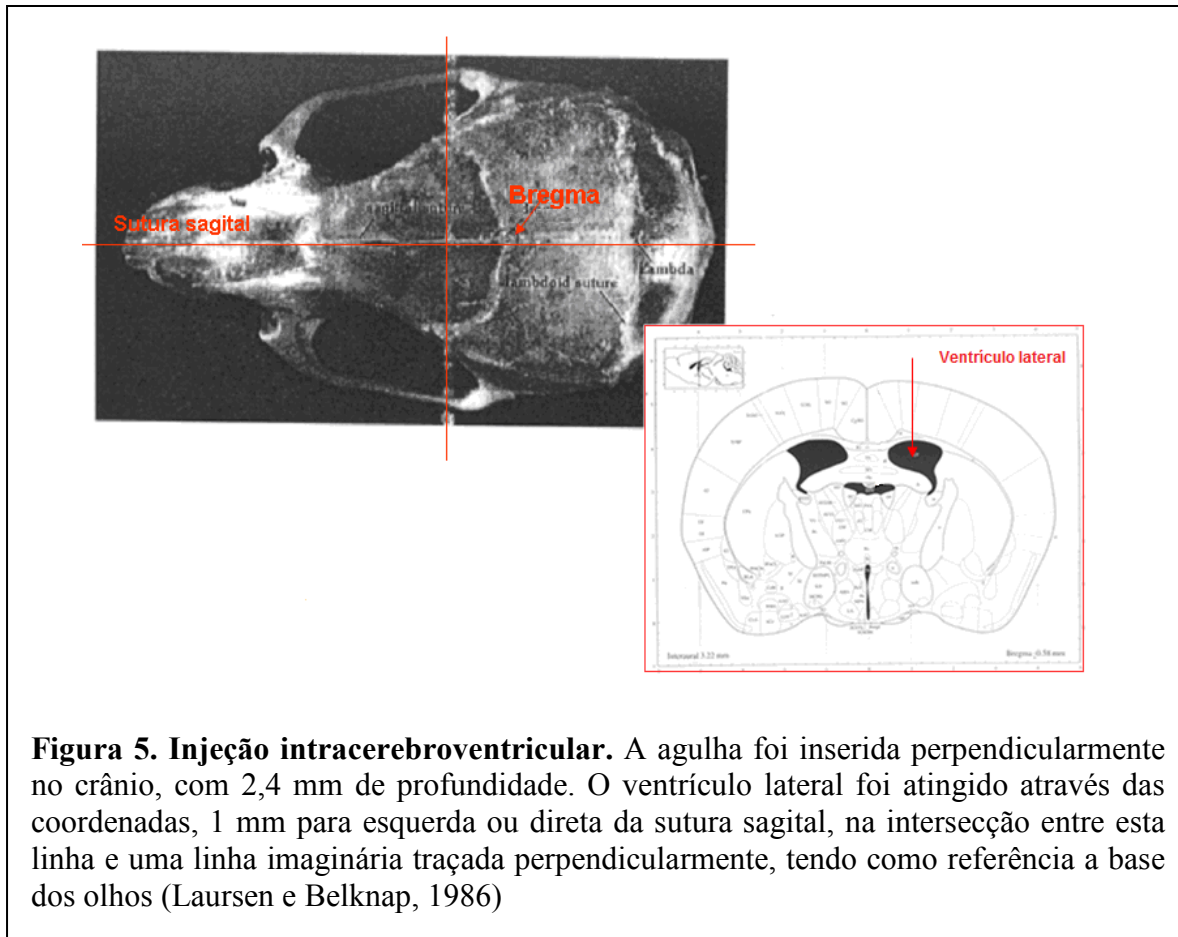


Figura 5. Injeção intracerebroventricular. A agulha foi inserida perpendicularmente no crânio, com 2,4 mm de profundidade. O ventrículo lateral foi atingido através das coordenadas, 1 mm para esquerda ou direita da sutura sagital, na intersecção entre esta linha e uma linha imaginária traçada perpendicularmente, tendo como referência a base dos olhos (Laursen e Belknap, 1986)

2.2. Envolvimento do sistema glutamatérgico

Os seguintes compostos foram utilizados: adenosina, cetamina, MK-801, N-metil-D-aspartato (NMDA) e cloreto de zinco (Sigma Chemical Co, USA), D-serina (Tocris).

A fim de verificar a influência do sistema glutamatérgico na ação antidepressiva da adenosina, os animais foram pré-tratados com NMDA (0,1 µg/sítio, agonista seletivo de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA, dose que não produz convulsão), D-serina (30 µg/sítio, agonista do sítio da glicina dos receptores NMDA) ou veículo. Decorridos 15 min os animais foram tratados com adenosina (10 mg/kg, i.p.) e submetidos ao TNF após 30 minutos. Alternativamente, para verificar a existência de um possível efeito sinérgico entre a adenosina e antagonistas de receptores NMDA, doses sub-ativas de MK801 (0,001 mg/kg, i.p., antagonista não competitivo de

receptores NMDA), cetamina (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores NMDA), cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p., inibidor de receptores NMDA) ou veículo foram administradas 20 minutos antes do tratamento dos animais com uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos o TNF foi realizado.

2.3. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico

Os seguintes compostos foram utilizados: adenosina, D-arginina, L-arginina, N^G-nitro-L-arginina (L-NNA), azul de metileno, [1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-one] (ODQ), S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) e sildenafil (Sigma Chemical Co, USA). Os fármacos foram diluídos em salina (NaCl 0,9%) exceto o ODQ, que foi dissolvido em salina com 1% de DMSO. A via de administração utilizada foi a i.p., exceto o SNAP e o ODQ, que foram administrado por via i.c.v.

Com o objetivo de verificar a participação da via L-arginina-óxido nítrico sobre a atividade antidepressiva da adenosina, os animais foram pré-tratados com L-arginina (750 mg/kg, i.p., precursor de óxido nítrico, NO), D-arginina (750 mg/kg, i.p., isômero inativo da L-arginina), sildenafil (5 mg/kg, i.p., inibidor seletivo da fosfodiesterase do tipo V, PDE-V) e SNAP (25 µg/sítio, i.c.v., doador de NO). Trinta minutos após a administração de L-arginina e D-arginina ou 15 minutos após a administração de SNAP os animais receberam adenosina (10 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF.

Adicionalmente, os animais foram pré-tratados com uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.). Decorridos 20 minutos, receberam a injeção de veículo, ODQ (3-30 pmol/sítio, i.c.v., inibidor da guanilato ciclase, GC), azul de metileno (4,6-18 mg/kg, i.p., inibidor da óxido nítrico sintase, NOS e da GC), L-NNA (0,003-0,3 mg/kg, i.p., inibidor da NOS) e após 30 minutos os animais foram testados no TNF.

2.4. Envolvimento dos canais de K⁺

Foram utilizados os seguintes compostos: adenosina, fluoxetina, L-arginina, sildenafil, tetraetilamônio (TEA) (Sigma Chemical Co, USA), caribdotoxina, cromacalim e glibenclamida (Tocris Cookson, Ballwin, MO, USA). O cromacalim foi dissolvido em salina com 10% de Tween 80, enquanto os demais compostos foram dissolvidos apenas em salina. A via de administração utilizada foi a i.c.v., exceto a adenosina, L-arginina, sildenafil e fluoxetina, que foram administradas por via i.p.

Para investigar o efeitos dos inibidores de canais de potássio no TNF, os animais foram tratados com glibenclamida (0,0005-5 ng/sítio, i.c.v., bloqueador de canais de potássio sensíveis à ATP), tetraetilamônio (0,025-25 ng/sítio, i.c.v., bloqueador de canais de potássio dependentes de voltagem e modulados por cálcio), caribdotoxina (0,025-25 ng/sítio, i.c.v., bloqueador de canais de potássio de alta condutância modulados por cálcio), apamina (0,01-1 ng/sítio, bloqueador de canais de potássio de baixa condutância modulados por cálcio) ou veículo. Decorridos 30 minutos os animais foram submetidos ao TNF ou ao teste do campo aberto.

Alternativamente, os animais foram pré-tratados com L-arginina (750 mg/kg, i.p.) ou sildenafil (5 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 minutos os animais foram tratados com os inibidores de canais de K⁺ ou veículo e submetidos ao TNF após 30 minutos

Para investigar a participação dos canais de potássio no efeito antidepressivo da adenosina, os animais foram tratados com uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.), fluoxetina (10 mg/kg, i.p., inibidor seletivo da recaptação de 5-HT, ISRS) ou veículo e após 20 minutos foram injetados com doses sub-ativas de glibenclamida (0,5 pg/sítio, i.c.v., bloqueador de canais de potássio sensíveis à ATP), tetraetilamônio (25 pg/sítio, i.c.v., bloqueador de canais de potássio dependentes de voltagem e modulados por cálcio), caribdotoxina (250 pg/sítio, i.c.v., bloqueador de canais de potássio de alta

condutância modulados por cálcio), apamina (10 µg/sítio, bloqueador de canais de potássio de baixa condutância modulados por cálcio) ou veículo. Decorridos 30 minutos os animais foram submetidos ao TNF.

Alternativamente os animais foram pré-tratados com cromacalim (10 µg/sítio, ativador de canais de potássio sensíveis à ATP) ou veículo. Decorridos 30 minutos os animais foram tratados com adenosina (10 mg/kg, i.p.), fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) ou veículo e submetidos ao TNF ou ao teste do campo aberto após 30 minutos.

2.5. Envolvimento do sistema serotoninérgico

Os seguintes compostos foram utilizados: adenosina, *R*(-)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropana HCl (DOI), fluoxetina, cetanserina, (+)-8-hidroxi-2-(di-*n*-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT), pindolol, *p*-clorofenilalanina metil éster (PCPA), *N*-{2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil}-*N*-(2-piridinil)ciclohexanocarboxamida (WAY100635), (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.), 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), 1-(2-metoxifenil)-4[-(2-phthalimido)butil]piperazine (NAN-190), 4-(2-[7-amino-2-{2-furil}{1,2,4}triazolo-{2,3-*a*}{1,3,5}triazin-5-il-amino]etil)fenol (ZM241385) (Tocris Cookson Inc., Ballwin, MO, U.S.A.). Todos os compostos foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%) e administradas por via i.p., exceto o NAN-190 e o pindolol que foram dissolvidos em salina com 1% de Tween 80 e o WAY 100635 que foi administrado por via s.c.

A fim de se investigar uma possível contribuição do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo da adenosina os animais foram pré-tratados com PCPA (100 mg/kg, um inibidor da síntese de 5-HT, uma vez por dia, por 4 dias consecutivos). Trinta minutos após a última injeção de PCPA, os animais foram tratados com adenosina (10 mg/kg), fluoxetina (32 mg/kg, controle positivo) ou veículo. Após 30

minutos os animais foram submetidos ao TNF. Para investigar a participação dos receptores 5-HT_{1A} no efeito antidepressivo da adenosina os animais foram pré-tratados com NAN-190 (0,5 mg/kg, antagonista de receptores 5-HT_{1A}), pindolol (32 mg/kg, antagonista de receptores 5-HT_{1A/1B}), WAY 100635 (0,3 mg/kg, s.c., antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}). Após 30 minutos os animais receberam adenosina (10 mg/kg) ou veículo e foram submetidos ao TNF após 30 minutos. Alternativamente, a adenosina foi administrada em dose sub-ativa (1 mg/kg) 20 minutos antes da administração de NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.), pindolol (32 mg/kg, i.p.), 8-OH DPAT (1 mg/kg, i.p., agonista de receptores 5-HT_{1A}), WAY 100635 (0,03 mg/kg, s.c.) ou veículo. Após 30 minutos os animais foram submetidos ao TNF.

Para investigar o envolvimento dos receptores 5-HT₂ na ação antidepressiva da adenosina no TNF os animais foram pré-tratados com cetanserina (5 mg/kg, antagonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}), ou veículo e após 30 minutos eles receberam adenosina (10 mg/kg) ou veículo e o TNF foi realizado 30 minutos depois. Alternativamente, uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg) ou o veículo foi administrada 20 minutos antes da administração de cetanserina (5 mg/kg), DOI (1 mg/kg, agonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}) ou veículo. Após 30 minutos, os animais foram submetidos ao TNF.

2.6. Envolvimento do sistema opióide

Os seguintes compostos foram utilizados: adenosina, naltrindol, naloxona, naloxona metiodida (Sigma, St. Louis, MO, USA), clocinamox, 2-(3,4-diclorofenil)-*N*-metil-*N*-[(1*S*)-1-(3-isotiocianatofenil)-2-(1 pirrolidinil)etil]acetamida (DIPPA), (Tocris Cookson, Ballwin, MO, USA), e morfina (Merck Darmstadt, Alemanha). Todos os compostos foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%), exceto clocinamox e DIPPA que

foram dissolvidos em salina com 10% de DMSO. A via de administração foi i.p., com exceção da morfina e da naloxona metiodida que foram administradas por via s.c.

A fim de investigar o envolvimento do sistema opióide na atividade antidepressiva da adenosina, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p., antagonista opióide não seletivo), naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c., análogo da naloxona que não ultrapassa a barreira hematoencefálica) ou veículo. Decorridos 15 minutos, os animais foram tratados com veículo ou adenosina (10 mg/kg, i.p.) e após mais 30 minutos, submetidos ao TNF ou ao teste do campo aberto. Alternativamente, foram investigados os sub-tipos de receptores opióides envolvidos na ação da adenosina no TNF. Com o objetivo de investigar o possível envolvimento dos receptores δ - μ e κ -opióide no efeito antidepressivo da adenosina, os animais foram pré-tratados com naltrindol (3 mg/kg, antagonista seletivo de receptores δ -opióide), clocinamox (1 mg/kg, antagonista de receptores μ -opióide), DIPPA (1 mg/kg, antagonista de receptores κ -opióide) ou veículo e após 30 minutos, 24 horas ou 48 horas, respectivamente foram tratados com adenosina (10 mg/kg) ou veículo. Decorridos 30 minutos eles foram submetidos ao TNF.

A fim de confirmar o envolvimento do sistema opióide na ação antidepressiva da adenosina no TNF, os animais foram tratados com uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.) ou com veículo e 20 minutos depois receberam uma injeção de morfina (1 mg/kg, s.c., agonista de receptores opióide). Alternativamente, os animais foram tratados com uma dose ativa de adenosina (10 mg/kg, i.p.) ou veículo e receberam uma dose de morfina (5 mg/kg, i.p.) capaz de reduzir o tempo de imobilidade no TNF, ou veículo após 20 minutos. Após 30 minutos os animais foram submetidos ao TNF ou ao teste do campo aberto.

3. Efeito da administração crônica de cafeína sobre as alterações comportamentais e na neuroplasticidade induzidas pelo estresse crônico imprevisível (ECI)

Os experimentos relatados a seguir foram realizados no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, sob a orientação do professor Rodrigo A. Cunha, como parte de um programa de estágio de Doutorado financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Estágio de Doutorando, bex 477206-7).

3.1. Estresse Crônico Imprevisível (ECI)

Foram utilizados camundongos da linhagem C57B6, machos de 6 semanas de idade no início do tratamento, mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal. O protocolo do ECI aplicado foi uma versão modificada daquele utilizado por Lu et al. (2005) e consiste na aplicação de diferentes tipos de agentes estressores, físicos e psicológicos, diariamente, por um período total de 21 dias (**Tabela 2**). Os animais foram mantidos em caixas individualizadas e pesados no início de cada semana. A cafeína foi administrada na água de beber diariamente, na dose de 1 g/l, quatro semanas antes do início do estresse e durante todo o protocolo de ECI. O KW6002 foi dissolvido em 0,5% de metilcelulose e administrado na dose de mg/l, três semanas antes do início do ECI e durante todo o protocolo. O grupo controle recebeu o veículo apropriado. Nos grupos utilizados como controle experimental, os animais não sofreram qualquer tipo de manipulação exceto pesagem e receberam apenas água para beber. Os parâmetros comportamentais foram avaliados com o TNF, teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e Labirinto em Y, conforme descrito no item 1.

Tabela 2. Protocolo do estresse crônico imprevisível

DIA	TIPO DE ESTRESSE	HORA
1	Exposição à caixa com maravalha molhada (cerca de 100 ml de água adicionados à caixa de residência)	9-9h
2	Pareamento com outro animal estressado	17-18h
3	Banho frio (15°C por 20 minutos)	10-10:20h
4	Confinamento (2h)	10-12h
5	Choque nas patas na caixa de esquiva (choques de 0,7 mA, com 3s de duração, dados intermitentemente por um tempo total de 5 minutos)	16h
6	Exposição à caixa de esquiva sem a realização dos choques	10h
7	Luz apagada durante o período claro do ciclo e caixa de residência sem maravalha	14-14h
8	Caixa de residência inclinada 45°	14-14h
9	Privação de água e comida	14-14h
10	Acesso à garrafa vazia	14-15h
11	Exposição à caixa com maravalha molhada (cerca de 100 ml de água adicionados à caixa de residência)	9-9h
12	Pareamento com outro animal estressado	10-11h
13	Banho frio (15°C por 20 minutos)	14h
14	Confinamento (3h)	14-17h
15	Choque nas patas na caixa de esquiva (choques de 0,7 mA, com 3s de duração, dados intermitentemente por um tempo total de 5 minutos)	14h
16	Exposição à caixa de esquiva sem a realização dos choques	9-10h
17	Privação de água e comida	9-9h
18	Acesso à garrafa vazia	9-10h
19	Confinamento (4h)	9-13h
20	Luz apagada durante o período claro do ciclo e caixa de residência sem maravalha	9-9h
21	Caixa de residência inclinada 45°	9-9h

3.2. Dosagem de corticosterona e cafeína plasmática

Os animais foram anestesiados com halotano e decapitados às 12h, o sangue do tronco foi coletado em tubos contendo heparina e centrifugado (5 min, 4000 rpm, 4°C). A medida dos níveis plasmáticos de corticosterona foi determinada por radioimunoensaio (MP Biomedicals). A medida dos níveis de cafeína foi determinada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A identificação e calibração dos picos obtidos nos cromatogramas foi feita por injeção de padrões com quantidades conhecidas de cafeína. A cafeína foi eluída em uma fase móvel contendo 5% de metanol.

3.3. Imunodeteção de proteínas por Western Blotting

3.3.1. Preparação dos extratos de membranas totais e sinaptossomas

Para detecção da densidade de diferentes proteínas foram preparadas amostras de membranas totais e membranas preparadas a partir dos terminais sinápticos do hipocampo de camundongos. Os animais foram sacrificados e tiveram os dois hipocampos removidos e homogeneizados em solução sacarose 0,32M¹. O homogenato foi centrifugado a 3000g por 10 minutos e o sobrenadante recolhido. Para a preparação dos extratos de membranas totais, o sobrenadante foi centrifugado a 25000g por 1 hora e o precipitado ressuspensão em 5% de SDS com fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Para preparação dos sinaptossomas, o sobrenadante foi centrifugado a 14000g por 12 minutos e o precipitado ressuspensão em 1 ml de solução de Percoll 45%². Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação de 2 minutos a 14000g, a camada superior, que

¹ Sacarose 0,32M, contendo 1mM de EDTA, 10mM de HEPES e 1 mg/mL de BSA.

² 45% v/v Percoll, 0.675 mM NaCl e 39.5 mL KHR

contém os sinaptossomas foi coletada e ressuspensa em solução de KHR³ e centrifugada por mais 2 minutos. O precipitado foi também ressuspensa em 5% de SDS com PMSF.

3.3.2. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BCA (Biorad), para detecção e quantificação colorimétrica de proteínas totais. A cada uma das amostras foi adicionado o reagente de BCA, que corresponde a uma mistura dos reagentes A⁴ e reagente B (sulfato de cobre 4%). A coloração púrpura resultante da reação, formada pela interação do reagente BCA com o íon cobre (Cu⁺¹), exibe uma alta absorvância à 570nm. A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada para a realização da curva padrão.

3.3.3. Preparação das amostras e SDS-PAGE e Western Blot

Cada amostra foi diluída em tampão desnaturante⁵ e aquecida a 98°C por 10 minutos para complementar a desnaturação das proteínas. Os extratos celulares e o padrão de peso molecular (Amersham) foram separados por eletroforese⁶ em gel de poliacrilamida 7,5% na presença de SDS (SDS-PAGE). Para imunodeteção das proteínas sinápticas sinaptofisina e SNAP-25 foram aplicados 10 µg de proteína, para GFAP foi aplicado 5 µg de proteína no gel. As proteínas foram eletrotransferidas⁷ do gel de poliacrilamida para membranas de difluoreto de polivinildieno (PVDF) previamente ativadas com metanol, durante 90 minutos a 750 mA, a 4 °C. As

³ Krebs HEPES Ringer , contendo 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM HEPES, 5 mM KCL e 5 mM de glicose.

⁴ Carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicincôninico e tartarato de sódio em 0.1M de hidróxido de sódio.

⁵ TRIS 0,5M, glicerol 30% , 10% de SDS, DTT 0,6M e 0,0012% de azul de bromofenol

⁶ Solução de electroforese: 0,2 M Tris, 1 M Bicina, 0,017 M SDS, pH=8,3

⁷ Solução de electrotransferência: 0,5 % NAOH 2 M, 10 % Metanol, pH= 11

membranas foram bloqueadas durante 1 hora com 3% BSA para evitar ligações inespecíficas e incubadas por 24 horas a 4 °C, com os anticorpos primário (anti-sinaptofisina e anti-SNAP-25 (1:5000, Sigma-Aldrich) ou anti-GFAP (1:1000, Sigma-Aldrich) diluídos em 3% BSA. As membranas foram então lavadas três vezes com TBS-t (0,1% de Tween 20 em TBS⁸) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com os anticorpos secundários específicos (1:2000, Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) conjugados à fosfatase alcalina, também diluídos em 3% BSA. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBS-t e reveladas com o sistema ECF (“Enhanced Chemifluorescence”, Amersham Life Sciences) e analisadas com o VersaDoc 3000 (Biorad, Hercules, CA, USA). A quantificação da imunorreatividade foi realizada por análise densitométrica das bandas utilizando o programa Quantity One (Biorad).

Para confirmar que concentrações similares de proteína foram aplicadas nos géis, as membranas foram posteriormente lavadas por 30 minutos com metanol 40% para remoção do ECF, com TBSt por 20 minutos e posteriormente com uma solução contendo glicina (0,1M pH 3,2) para a remoção dos anticorpos. As membranas foram novamente bloqueadas com 3% de BSA por 1 hora e marcadas com o anticorpo primário para α -tubulina (1:1000 Sigma-Aldrich) e secundário específico conjugado à fosfatase alcalina, conforme descrito anteriormente.

3.4 Histoquímica e Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com tiopental (10 mg/kg) e perfundidos com o auxílio de uma bomba peristáltica por via transcardíaca,

⁸ Tampão Tris/SDS: 0,5M de Tris, 0,4%SDS pH 6,8

inicialmente com tampão Sorensen 0,15M⁹, seguido de paraformaldeído 4% (pH 7,4, feito em tampão Sorensen 0,6M). Uma cânula foi introduzida e fixada na porção ascendente da aorta. O sistema vascular foi primeiramente lavado com tampão Sorensen 0,15M para retirada do sangue, seguido pela fixação dos tecidos com paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram removidos e colocados em paraformaldeído 4% para a pós-fixação por 24 horas e transferidas para uma solução de sacarose 30% para crioproteção. Os encéfalos foram cortados em secções coronais de 20µM de espessura com o auxílio de um criostato. As fatias foram dispostas em séries representativas do hipocampo e armazenadas em placas de 48 poços contendo PBS com azida a 4°C.

3.4.1 Fluoro-Jade C

Fluoro-Jade C é uma molécula aniônica capaz de marcar neurônios em degeneração (Schmued et al., 1997). Uma série de fatias foi montada em lâminas de vidro gelatinizadas e deixada em temperatura ambiente para secar. As lâminas foram então imersas em uma solução de etanol 80% com 0,1% de NaOH por 5 minutos. Após este passo, as lâminas foram colocadas por 1 minuto em etanol 70%, lavadas em água destilada por 2 minutos e transferidas para uma solução de 0,06% de permanganato de potássio onde permaneceram em agitação durante 10 minutos. Após mais uma lavagem de 2 minutos em água destilada, as lâminas foram transferidas para a solução de Fluoro-Jade C 0,001% (Histo-Chem Inc., Jefferson, AR, USA) e agitadas por mais 10 minutos. Após a coloração, foram lavadas três vezes por 1 minuto com água destilada e colocadas para secar em uma estufa a 37 °C. Depois de secas, as lâminas foram imersas em xileno e as lamínulas montadas com a adição do meio de montagem DPX (Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI). A análise da marcação foi feita com o auxílio de um

⁹ KH₂PO₄ 14,85 g e Na₂HPO₄.2H₂O 87,36 g para 1000 mL de água destilada, pH 7,4.

microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert 200) utilizando-se um sistema de filtros para visualização da fluoresceína ou FITC.

3.4.2 Imunoistoquímica para CD11b

Outra série de fatias foi utilizada para marcação das células da microglia com o anticorpo para a glicoproteína CD11b. As fatias foram mantidas em placas de 48 poços (duas fatias por poço) e lavadas com PBS três vezes de 10 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito através da adição de uma solução de TBS contendo Triton X-100 0,2% e 10% de soro fetal bovino a cada um dos poços por 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo primário anti-CD11b¹⁰ (1:500, Serotec) foi adicionado aos poços e incubado por 48 horas a 4 °C. As fatias foram lavadas três vezes em 0,1M de PBS contendo 2% de soro fetal bovino durante 10 minutos. O anticorpo secundário biotilado (horse anti-mouse IgG 1:200) foi adicionado às fatias, que permaneceram 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos com PBS, as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas através da adição do meio de montagem Vectaschield H-1400 (Laboratório Vector). A análise da marcação foi feita no microscópio de fluorescência utilizando-se um sistema de filtros para visualização da fluoresceína ou FITC.

3.4.3 Imunoistoquímica para proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

Uma segunda série de fatias, também montada em lâminas de vidro gelatinizadas, foi utilizada para marcação com GFAP. As lâminas foram imersas em PBS por 5 minutos e em TBS por três vezes de 5 minutos. As ligações inespecíficas foram bloqueadas através da imersão das lâminas em uma solução de TBS contendo

¹⁰ Diluído em TBS contendo triton X-100 0,2% e 10% de soro fetal bovino.

Triton X-100 0,2% e 10% de soro fetal bovino por 1 hora a temperatura ambiente. O anticorpo monoclonal anti-GFAP (1:500, clone G-A-5 Cy3 conjugate- Purified mouse immunoglobulin C-9205, Sigma-Aldrich) foi colocado diretamente sobre as fatias e incubado por 48 horas a 4 ° C.

As lâminas foram então lavadas duas vezes com TBS por 10 minutos e uma vez em água destilada. As secções foram desidratadas através da passagem por várias concentrações de etanol (etanol 70%, etanol 80%, etanol 95%) e passadas por xileno. As lâminas foram montadas com lamínulas através da adição do meio de montagem Vectaschield H-1400 (Laboratório Vector) e analisadas no microscópio de fluorescência utilizando-se um sistema de filtros para visualização da rodopsina.

3.4.4 Análise das imagens

As imagens foram fotografadas no microscópio de fluorescência com objetivas de 20 e 40 vezes e posteriormente analisadas no programa ImageJ. A quantificação da imunorreatividade foi feita em cada uma das fatias nas regiões CA1, CA3 e giro denteado.

4. Análise estatística

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias (de acordo com o protocolo experimental), seguido pelo *post-hoc* de Newman-Keuls quando apropriado. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Capítulo 3

**Efeito antidepressivo da administração aguda de adenosina no teste do
nado forçado: mecanismo de ação**

1. Introdução

1.1. Sistema glutamatérgico (receptores NMDA) e via da L-arginina-óxido nítrico (NO)

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, fundamental na regulação da plasticidade sináptica, crescimento e diferenciação celular. Além disso, está envolvido no processamento e execução de atividades motoras e em diversas outras funções fisiológicas como aprendizado, memória e motivação (Danysz e Parsons, 1988). No entanto, um aumento da atividade glutamatérgica leva à excitotoxicidade sendo frequentemente associado a condições patológicas, como epilepsia e doença de Alzheimer, esquizofrenia, entre outras (para revisão ver Kornhuber e Weller, 1997).

O glutamato exerce suas ações através da estimulação de receptores específicos, classificados com base em características estruturais e farmacológicas em metabotrópicos ou ionotrópicos, estes últimos incluem o NMDA, AMPA e cainato. Os receptores NMDA são canais iônicos com uma alta permeabilidade aos íons Ca^{2+} que podem ser modulados por ligantes e por voltagem. No estado de repouso, apresentam a ligação de um íon magnésio no interior do canal, bloqueando a passagem da corrente iônica. Mediante uma despolarização, geralmente obtida pela ativação prévia de receptores AMPA e influxo de sódio, o magnésio é deslocado e o canal desbloqueado, permitindo o influxo de cálcio (para revisão ver Molinoff et al., 1994). Estes receptores apresentam uma característica única que é a presença de um sítio de ligação para um co-agonista, glicina ou D-serina, e o glutamato não é capaz de promover sua ativação a menos que o sítio do co-agonista esteja ocupado (Johnson e Ascher, 1987; McBain et al., 1989, Wolosker et al., 2008).

Um grande número de evidências tem associado a depressão maior a uma disfunção na sinalização glutamatérgica, especialmente alterações nos receptores NMDA. As vias glutamatérgicas são difusas, partem do córtex pré-frontal, atingindo uma série de estruturas subcorticais potencialmente envolvidas na sintomatologia dos distúrbios de humor, como o núcleo acumbens (anedonia), complexo amigdalóide (medo e ansiedade), sistema límbico (humor deprimido, prejuízo mnemônico) e hipotálamo (eixo HPA, apetite, sono), além de integrar outras áreas corticais.

Além disso, muitos estudos pré-clínicos demonstram que antagonistas de receptores NMDA possuem propriedades antidepressivas em modelos animais, como o estresse crônico, desamparo aprendido, modelos de bulbectomia olfatória e de desespero comportamental, como o TNF e o TSC (Skolnick, 1999; Kugaya e Sanacora, 2005). A administração de antagonistas de receptores NMDA mimetiza o efeito de antidepressivos, revertendo a anedonia induzida pelo estresse crônico moderado (Papp e Moryl, 1994) e potencializa a atividade da fluoxetina, venlafaxina e imipramina em modelos animais (Rogoz et al., 2002). Por outro lado, o tratamento crônico com fármacos antidepressivos atenua a função de receptores NMDA (Nowak et al., 1993; Paul et al., 1994; Boyer et al., 1998), influencia no seu perfil de ligação e altera a expressão regional do RNAm que codifica suas subunidades (Skolnick et al., 1996; Petrie et al., 2000).

Trabalhos clínicos demonstram ainda que a administração do antagonista de receptores NMDA, cetamina, causa uma melhora significativa dos sintomas depressivos em pacientes (Berman et al., 2000). Contudo, a evidência clínica mais significativa que aponta uma importante função do sistema glutamatérgico no tratamento dos distúrbios de humor vem da extensa utilização do anticonvulsivante lamotrigina no tratamento da fase depressiva do transtorno bipolar (Calabrese et al., 1999). A lamotrigina tem

múltiplos efeitos celulares, inibindo canais de sódio e cálcio. No entanto, uma inibição da liberação excessiva de glutamato parece ser o mecanismo primário (Calabrese et al., 1999). Contudo, em modelos animais, seu efeito parece ser também dependente do envolvimento do sistema noradrenérgico e serotoninérgico (Bourin et al., 2005; Consoni et al., 2006; Kaster et al., 2007).

Com bases nestas evidências, Skolnick (1999) propôs que os inibidores da ativação do receptor NMDA podem se constituir em uma nova classe de antidepressivos, com efeito terapêutico mais breve que os antidepressivos clássicos. Contudo, os antagonistas clássicos de receptores NMDA estão frequentemente associados a efeitos adversos, o que dificulta a utilização clínica destes compostos (Kornhuber e Weller, 1997).

O conceito de óxido nítrico (NO) como molécula de sinalização celular começou a surgir na década de 70 em trabalhos que procuravam pelo transmissor gerado em resposta à ativação de receptores NMDA e capaz de aumentar os níveis de GMPc (Ferrendeli et al., 1974; 1976). Desde então, seu papel tem sido relacionado a regulação de vários processos comportamentais, cognitivos e emocionais, incluindo memória e aprendizado, agressão, ansiedade e depressão (Wiley et al., 1995; Holscher, 1997; Harkin et al., 1999; Da Silva et al., 2000). O NO é produzido durante a conversão do aminoácido L-arginina em citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Três isoformas da NOS foram caracterizadas, e incluem uma isoforma expressa em células endoteliais (NOSe), uma isoforma induzida, usualmente expressa após ativação do sistema imunológico, especialmente nas células microgliais (NOSi), e a isoforma neuronal (NOSn) (Paakkari e Lindsberg 1995). A NOS neuronal é a forma mais abundante, presente tanto no sistema nervoso periférico quanto no SNC, especialmente nas espinhas dendríticas (Dreyer et al. 2004). Ela é ativada pelo complexo

Ca²⁺/calmodulina em resposta ao influxo de Ca²⁺ induzido principalmente pela estimulação dos receptores NMDA. Sua associação física à sub-unidade NR2B dos receptores NMDA e à proteína da densidade pós-sináptica PSD-95 (Brenman et al., 1996), ajuda a explicar a íntima ligação entre ativação de receptores NMDA e produção de NO. As ações fisiológicas do NO são mediadas principalmente pela estimulação da enzima GC, responsável pela produção de guanosina 3'5'-monofosfato cíclico (GMPc) (Schuman e Madison, 1991). O aumento nos níveis de GMPc modula a atividade de vários alvos intracelulares como proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) e canais iônicos (Garthwaite e Boulton, 1995) (**Figura 6**).

Vários estudos pré-clínicos demonstram que inibidores da NOS como o L-NNA, L-NAME e 7-nitrindazol, e inibidores da GC, como o 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), tem propriedades antidepressivas em modelos animais (Harkin et al., 1999; Yildiz et al., 2000; Da Silva et al., 2000; Heiberg et al., 2002; Harkin et al., 2003, Volke et al., 2003). Além disso, o estresse crônico moderado causa um aumento na expressão da NOSn no hipocampo, associado a um perfil depressivo e diminuição da neurogênese em camundongos. Já a depleção genética desta enzima ou o tratamento com inibidores específicos restauram a neurogênese e o perfil comportamental dos animais submetidos ao estresse (Zhou et al., 2007). Trabalhos clínicos demonstram ainda, que as concentrações plasmáticas de nitrato são significativamente maiores em pacientes deprimidos quando comparado aos controles, sugerindo que a produção de NO está aumentada na depressão (Suzuki et al., 2001).

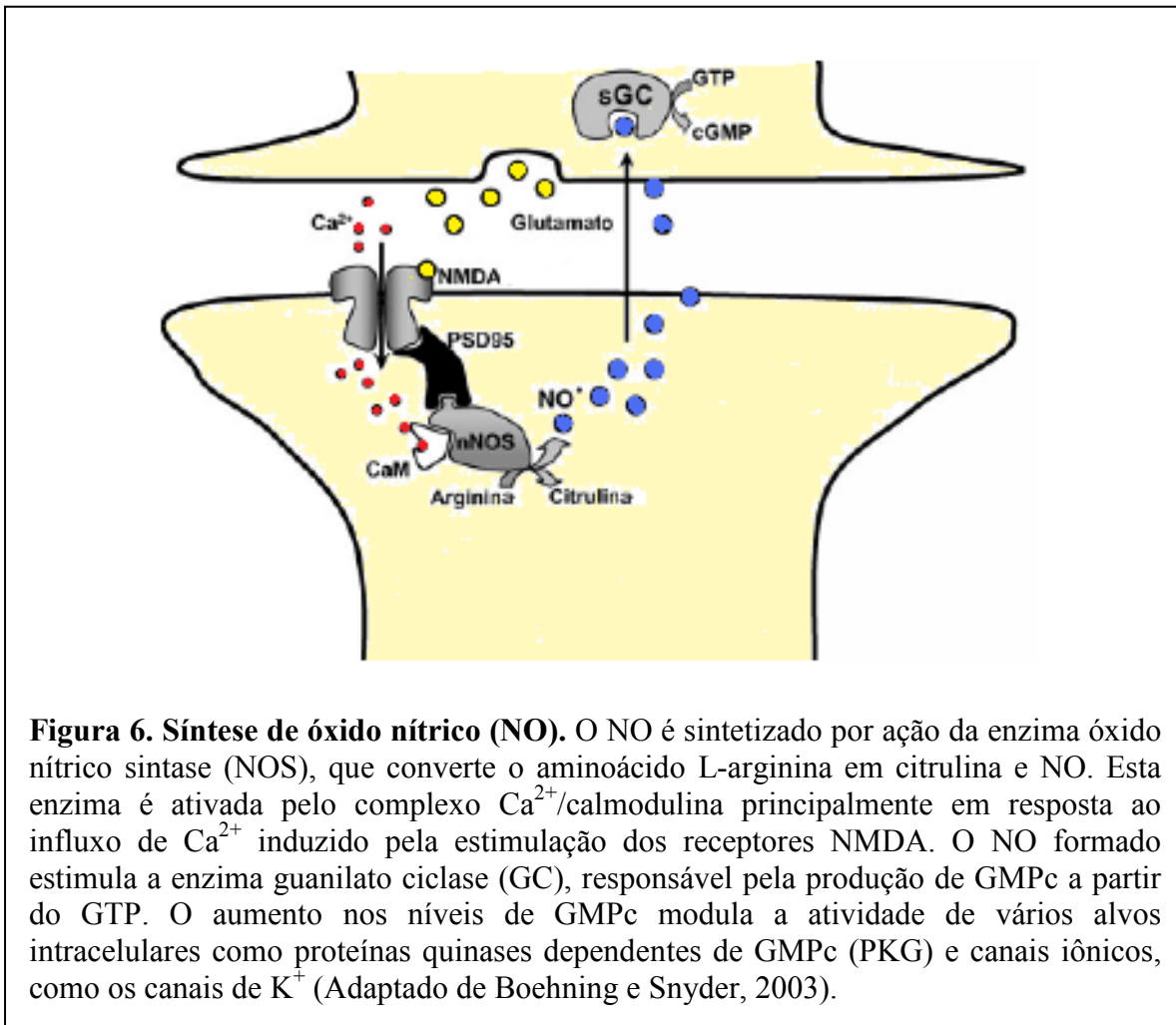


Figura 6. Síntese de óxido nítrico (NO). O NO é sintetizado por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que converte o aminoácido L-arginina em citrulina e NO. Esta enzima é ativada pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina principalmente em resposta ao influxo de Ca^{2+} induzido pela estimulação dos receptores NMDA. O NO formado estimula a enzima guanilato ciclase (GC), responsável pela produção de GMPc a partir do GTP. O aumento nos níveis de GMPc modula a atividade de vários alvos intracelulares como proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) e canais iônicos, como os canais de K^+ (Adaptado de Boehning e Snyder, 2003).

1.2. Canais de potássio (K^+)

Os canais de K^+ são membros de uma família de proteínas que permite a rápida difusão de íons K^+ pela membrana plasmática, a favor de um gradiente de concentração. Eles desempenham um papel fundamental no controle da excitabilidade neural e propagação de sinal pelo sistema nervoso. A abertura destes canais leva a uma hiperpolarização da membrana plasmática, resultando em uma redução na excitabilidade da célula (MacKinnon, 2003). A diversidade entre os membros desta família está relacionada principalmente com o tipo de estímulo capaz de causar a abertura do canal e difusão dos íons K^+ , processo que é regulado por uma variedade de estímulos como: alterações na voltagem da membrana plasmática, níveis intracelulares de certos íons e moléculas orgânicas e proteínas (Ca^{2+} , ATP, AMPc, sub-unidades de proteínas G).

Baseado nestas diferenças estruturais os canais de K^+ foram divididos em quatro subtipos: dependentes de voltagem, ativados por cálcio, canais de K^+ retificadores de influxo e canais de K^+ de dois poros. A manipulação farmacológica destes canais pode representar uma ferramenta no controle de uma série de doenças do SNC, como a epilepsia, demência, ansiedade e depressão (Wickenden, 2002).

O envolvimento dos canais de K^+ na modulação da depressão tem sido sugerido por alguns estudos pré-clínicos. A administração de inibidores de diferentes tipos de canais de K^+ como tetraetilamônio (TEA), apamina, caribdotoxina, gliquidona e glibenclamida produz um efeito antidepressivo no TNF (Galeotti et al., 1999), enquanto ativadores destes canais, como o cromacalim e o minoxidil, promovem um efeito depressogênico, aumentando o tempo de imobilidade dos animais no mesmo teste (Redrobe et al., 1996; Galeotti et al., 1999). Inan e colaboradores (2004) demonstraram que a administração de sertralina, um inibidor seletivo da recaptação de 5-HT, potencializa o efeito antidepressivo do TEA e da 3,4-diaminopiridina, dois bloqueadores de canais de K^+ no TNF. Além disso, a administração de gliburida, um inibidor de canais de K^+ modulados por ATP ou quinina, um bloqueador de canais de K^+ ativados por cálcio, produz um efeito sinérgico com antidepressivos no TNF (Guo et al., 1995; 1996).

O bloqueio de canais de K^+ aumenta a liberação de 5-HT em fatias de hipocampo de ratos (Schechter, 1997). Estudos também demonstram que a fluoxetina age com um potente bloqueador de canais iônicos, especialmente os canais de K^+ , podendo afetar a excitabilidade dos neurônios hipocámpais (Tygat et al., 1997; Yeung et al., 1999; Choi et al., 2004). Um trabalho recente sugere ainda, que o tratamento crônico com inibidores seletivos da recaptação de 5-HT, reduz a ativação de receptores $5-HT_{1A}$ não por causar uma diminuição em sua expressão, mas por reduzir a expressão de canais

de K^+ ativados por subunidades de proteínas G e funcionalmente acoplados a estes receptores (**Figura 7**). Assim, McGehee (2007) propõe que a ação desta classe de antidepressivos parece envolver uma redução do tônus inibitório que ocorre pela ativação de vários receptores metabotrópicos funcionalmente acoplados a este tipo de canal de K^+ .

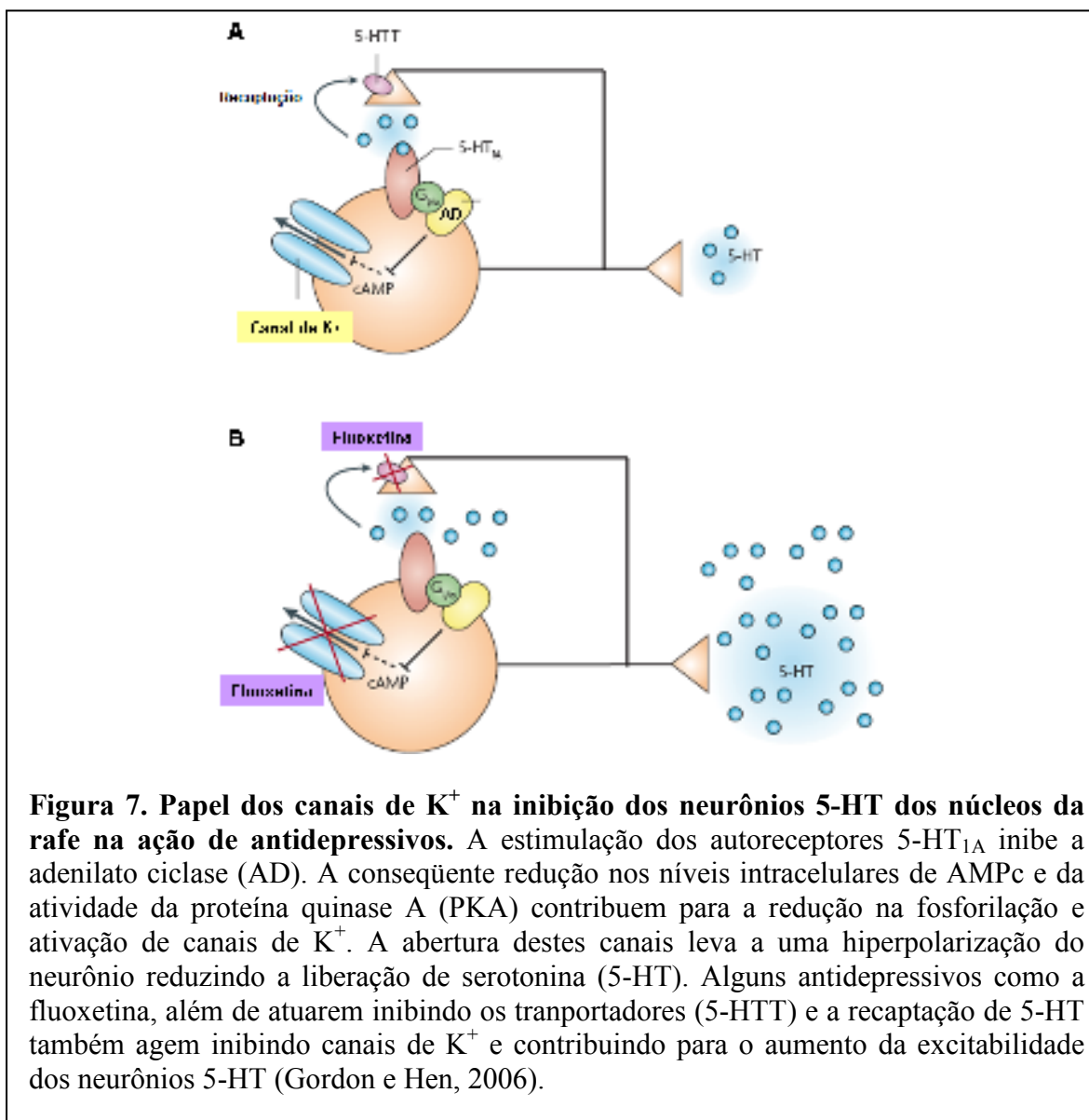


Figura 7. Papel dos canais de K^+ na inibição dos neurônios 5-HT dos núcleos da rafe na ação de antidepressivos. A estimulação dos autoreceptores $5-HT_{1A}$ inibe a adenilato ciclase (AD). A consequente redução nos níveis intracelulares de AMPc e da atividade da proteína quinase A (PKA) contribuem para a redução na fosforilação e ativação de canais de K^+ . A abertura destes canais leva a uma hiperpolarização do neurônio reduzindo a liberação de serotonina (5-HT). Alguns antidepressivos como a fluoxetina, além de atuarem inibindo os transportadores (5-HTT) e a recaptação de 5-HT também agem inibindo canais de K^+ e contribuindo para o aumento da excitabilidade dos neurônios 5-HT (Gordon e Hen, 2006).

1.3. Sistema Serotoninérgico

No cérebro, a 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido triptofano exclusivamente em neurônios localizados nos núcleos da rafe. No entanto, as vias

serotoninérgicas são muito difusas e destes núcleos projetam-se para todas as partes do SNC, controlando uma grande variedade de funções fisiológicas como ingestão de alimentos, ciclo sono e vigília, memória, termorregulação, comportamento sexual, locomoção, função endócrina, entre outras. O sistema límbico, em particular o hipocampo, recebe uma densa projeção de neurônios serotoninérgicos, o que reforça o papel deste neurotransmissor no controle dos estados de humor (Jacobs e Azmitia, 1992).

O sistema serotoninérgico foi o primeiro sistema reconhecido como importante na etiologia e tratamento dos distúrbios psiquiátricos. Fármacos que atuam sobre este sistema são, ainda hoje, amplamente utilizados no tratamento de doenças relacionadas ao estresse como a depressão e a ansiedade e representam 80% de todos antidepressivos no mercado (Risch e Nemeroff, 1992; Elhwuegi, 2004). Durante os últimos 20 anos, uma série de receptores serotoninérgicos foram clonados e caracterizados. Hoje, pelo menos 14 genes que codificam estes receptores são conhecidos, contudo, modificações pós-transdução resultam em mais de 30 sub-tipos de receptores (Barnes e Sharp, 1999, Nichols e Nichols, 2008) (**Figura 8**).

Os receptores 5-HT_{1A} interagem essencialmente com proteínas G inibitórias, diminuindo a atividade da adenilato ciclase. Sua modulação parece desempenhar um papel primordial na regulação do humor e no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos (Lanfumeij e Hamon, 2004). Estudos demonstram que a depressão está associada a uma redução no “*binding*” de receptores 5-HT_{1A} (Sargent et al., 2000) e um polimorfismo no gene que codifica estes receptores foi recentemente associado a um aumento na vulnerabilidade à depressão maior (Lemondet et al 2003).

Os receptores 5-HT_{1A} estão expressos tanto pós-sinapticamente em estruturas límbicas e corticais, quanto pré-sinapticamente, na porção somatodendrítica dos

neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe (autorreceptores). Desta maneira, são capazes de controlar a transmissão serotoninérgica, inibindo a liberação de 5-HT e a taxa de disparo dos neurônios (Sprouse e Aghajanian, 1987). Uma série de evidências tem demonstrado que alterações adaptativas nestes receptores estão envolvidas no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos (Hensler, 2002). A atividade dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe é inibida pela administração aguda de antidepressivos (Quinaux, 1982; Blier e Montigny, 1994). Por outro lado, o tratamento crônico com antidepressivos, assim como a depleção genética dos 5-HTT induz uma dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A}, sem causar alteração nos receptores pós-sinápticos (Chaput et al., 1986; Le Poul et al., 2000; Mannoury la Cour et al., 2001). Desta maneira, os autorreceptores limitam o aumento da concentração de 5-HT na fenda sináptica e a ativação dos receptores de 5-HT pós-sinápticos. Assim, sugere-se que a dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A} levaria a um aumento na atividade dos neurônios serotoninérgicos, fato que explicaria a demora na remissão clínica dos sintomas após o início do tratamento com antidepressivos.

De fato, foi demonstrado que o bloqueio de receptores 5-HT_{1A} é capaz de aumentar a resposta antidepressiva (Artigas, 1996), e o antagonista de receptores 5-HT_{1A} pindolol foi utilizado em alguns estudos clínicos administrado em associação com inibidores seletivos da recaptção de 5-HT (ISRS) para acelerar a resposta terapêutica, contudo, os resultados foram bastante contraditórios. Além disso, apesar das evidências experimentais, os agonistas seletivos de receptores 5-HT_{1A} desenvolvidos até agora não demonstraram eficácia clínica. Alguns agonistas parciais destes receptores como a buspirona, gepirona ou tandospirona induzem efeitos antidepressivos, mas com uma eficácia muito reduzida em comparação a outras classes de antidepressivos (Blier e Ward, 2003).

Os receptores 5-HT₂ agem primariamente em proteínas G associadas à fosfolipase C. Estes receptores também estão amplamente distribuídos em áreas límbicas e corticais, em um padrão que sugere que podem estar envolvidos na modulação dos distúrbios de humor (Borsini, 1995). A regulação dos receptores 5-HT₂, especificamente dos sub-tipos 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, ganhou importância com trabalhos que demonstraram que o tratamento com antidepressivos causa uma redução na sua expressão (Celada et al., 2004). O bloqueio dos receptores 5-HT₂ leva a uma potencialização do efeito antidepressivo da imipramina e de inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRN) (Redrobe e Bourin, 1997; Marek et al., 2003). Além disso, alguns fármacos antidepressivos como a nefazodona, trazodona e mirtazapina são antagonistas de receptores 5-HT_{2A}, propriedade que pode contribuir para seus efeitos clínicos (Celada et al., 2004). Polimorfismos no gene que codifica os receptores 5-HT₂ também já foram associados a um aumento na vulnerabilidade à depressão e ao risco de suicídio (Enoch et al., 1999; Du et al., 2000; Arias et al., 2001; Du et al., 2001; Holmes et al., 2003). Entretanto, mais recentemente a redução na expressão de receptores 5-HT₂ localizados em neurônios dopaminérgicos, e conseqüente aumento da atividade destes neurônios, tem sido relacionada aos efeitos antidepressivos mediados por estes receptores (Landén e Thase, 2006).

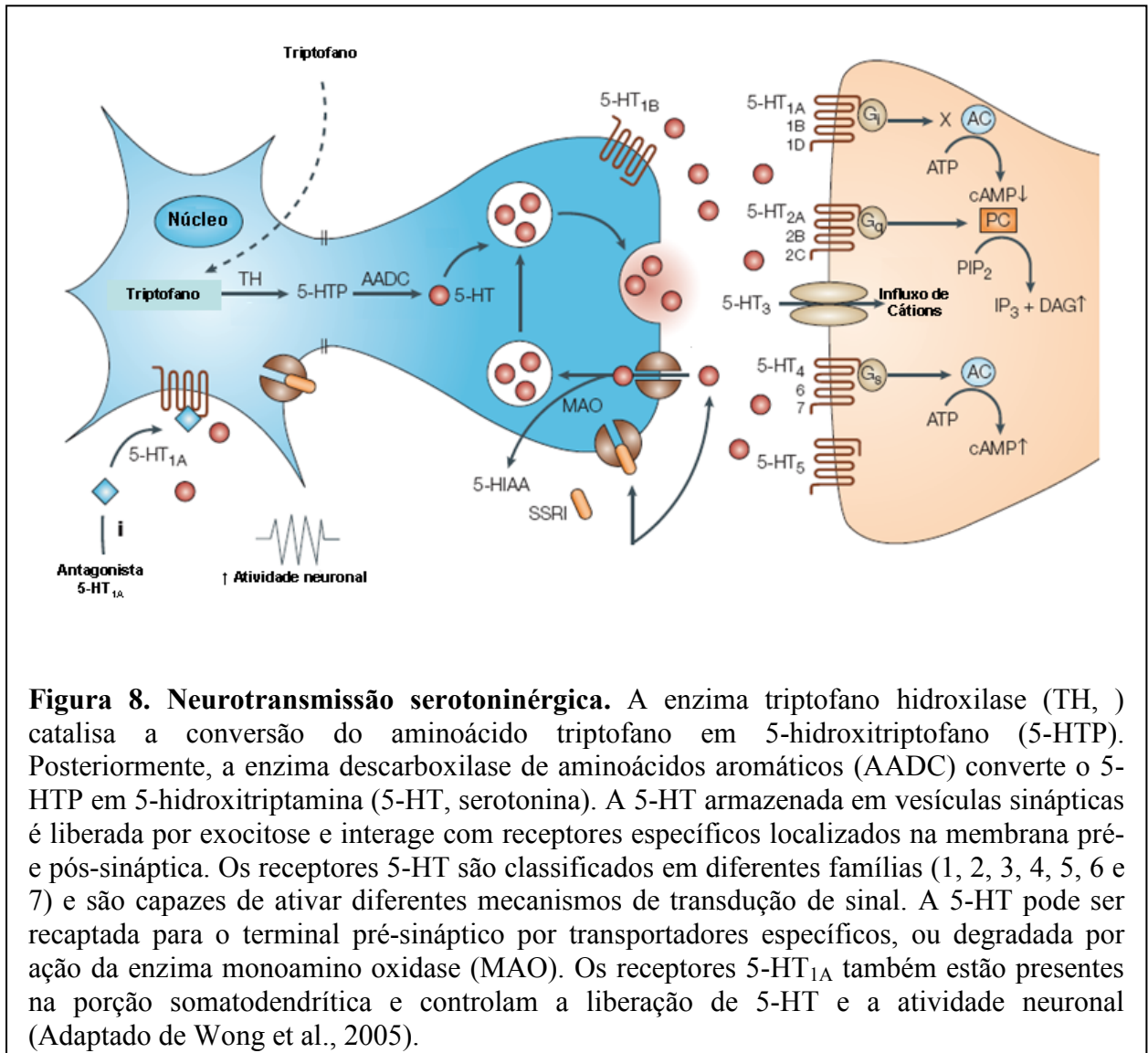


Figura 8. Neurotransmissão serotoninérgica. A enzima triptofano hidroxilase (TH,) catalisa a conversão do aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Posteriormente, a enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC) converte o 5-HTP em 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina). A 5-HT armazenada em vesículas sinápticas é liberada por exocitose e interage com receptores específicos localizados na membrana pré- e pós-sináptica. Os receptores 5-HT são classificados em diferentes famílias (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e são capazes de ativar diferentes mecanismos de transdução de sinal. A 5-HT pode ser recaptada para o terminal pré-sináptico por transportadores específicos, ou degradada por ação da enzima monoamino oxidase (MAO). Os receptores 5-HT_{1A} também estão presentes na porção somatodendrítica e controlam a liberação de 5-HT e a atividade neuronal (Adaptado de Wong et al., 2005).

1.4. Receptores opióides

O sistema opióide é composto por uma família de peptídeos (β -endorfinas, encefalinas e dinorfinas) que atuam em três diferentes sub-tipos de receptores, mu (μ), delta (δ), e kappa (κ), todos acoplados a proteínas G inibitórias. Eles inibem a adenilato ciclase, aumentam a condutância da membrana aos íons K^+ e reduzem as correntes mediadas por canais de Ca^{2+} , levando à hiperpolarização da célula (Akil et al., 1997). Os neurônios que contêm peptídeos opióides e seus receptores estão amplamente distribuídos no SNC, e participam do controle de muitas ações fisiológicas e

comportamentais como a modulação do sistema de motivação e recompensa, nocicepção e ingestão de alimentos (Akill et al., 1997; Barry e Zuo, 2005).

Uma série de estudos farmacológicos, neuroquímicos e comportamentais sugere que o sistema opióide pode estar envolvido nos distúrbios de humor. Opióides endógenos e seus receptores são encontrados em grandes concentrações em regiões do sistema límbico associadas à regulação do humor. Além disso, a íntima relação entre o sistema opióide e os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico reforça esta relação (Mansour et al., 1988). Trabalhos clínicos demonstraram que compostos como a β -endorfina e a buprenorfina têm propriedades antidepressivas (Kline et al., 1977; Darko et al., 1992; Bodkin et al., 1995). Além disso, inibidores da enzima que degrada as encefalinas também foram efetivos em diferentes modelos animais de depressão (De Felipe et al., 1989; Baamonde et al., 1992; Tejedor-Real et al., 1998). Evidências sugerem que os receptores opióides estão envolvidos no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos de várias classes (De Felipe et al., 1989; Baamonde et al., 1992). A terapia eletroconvulsiva, indicada no tratamento da depressão refratária, aumenta os níveis plasmáticos de β -endorfina (Ghadirian et al., 1988).

Agonistas de receptores δ -opióide são efetivos em vários modelos animais de depressão em roedores (Tejedor-Real, et al., 1998; Saitoh et al., 2004). Além disso, o tratamento crônico com imipramina reduz a densidade de receptores δ -opióide no córtex frontal de ratos (Varona et al., 2003). Tem sido demonstrado que agonistas μ -opióide como a oxicodona e a oximorfona, melhoram o humor em pacientes com depressão severa e refratária (Stoll e Rueter, 1999). Além disso, o tratamento com antagonistas de receptores κ -opióide produz um efeito antidepressivo, reduzindo o tempo de imobilidade dos animais no TNF (Mague et al., 2003) e recuperando os sintomas

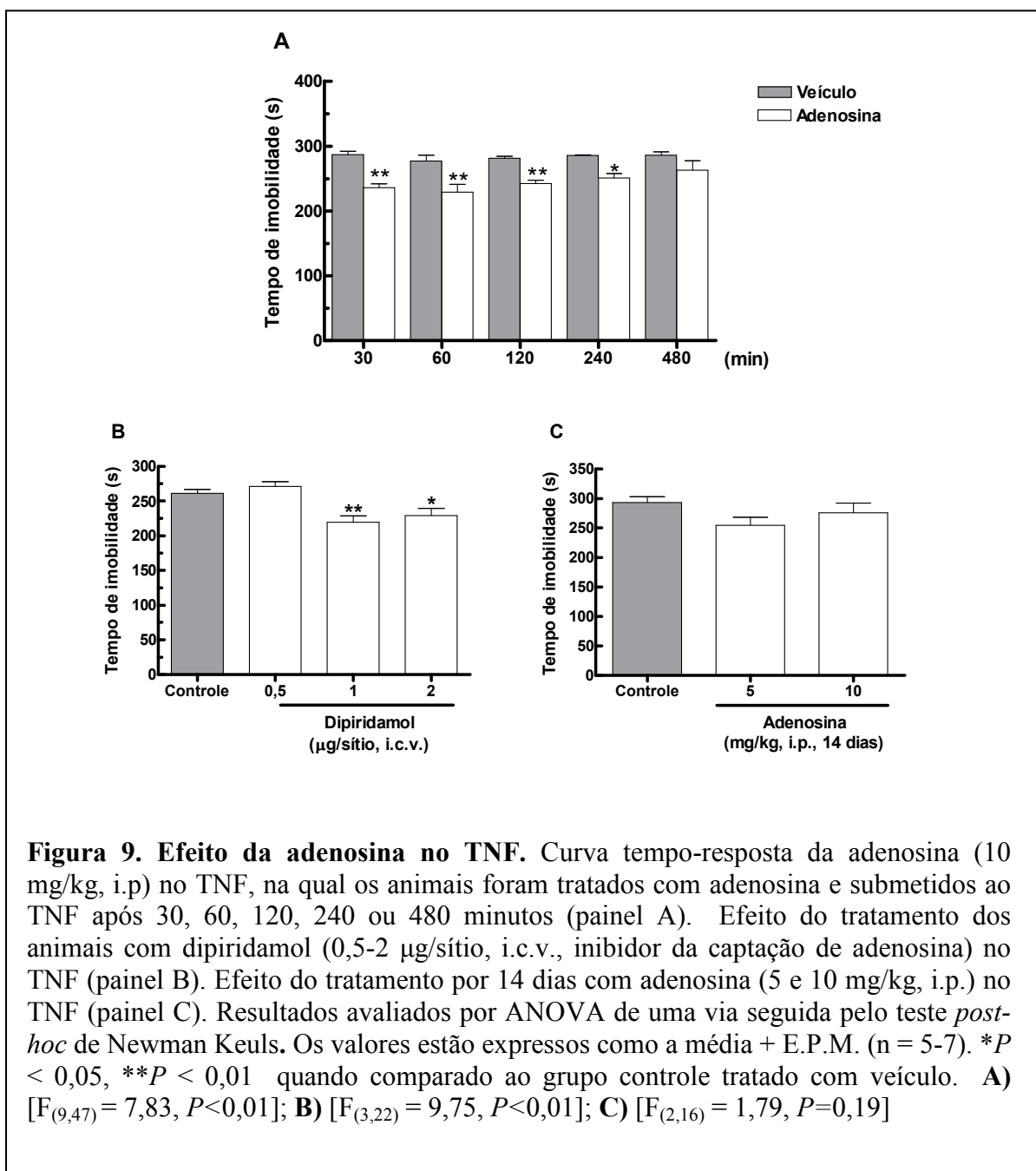
depressivos induzidos pelo modelo do desamparo aprendido em roedores (Shirayama, et al., 2004).

Tendo em vista o envolvimento de vários sistemas de neurotransmissores na patofisiologia e tratamento dos distúrbios do humor, e o papel do sistema adenosinérgico como sistema homeostático envolvido em diversas condições fisiológicas e patológicas, já discutidas no capítulo 1; os objetivos deste capítulo são: 1) Investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico (receptores NMDA), da via da L-arginina-NO, dos canais de K⁺, dos sistemas serotoninérgico e opióide no efeito antidepressivo causado pela administração aguda de adenosina no TNF.

2. Resultados

2.1. Envolvimento dos receptores NMDA e da via da L-arginina-NO no efeito antidepressivo da adenosina no TNF

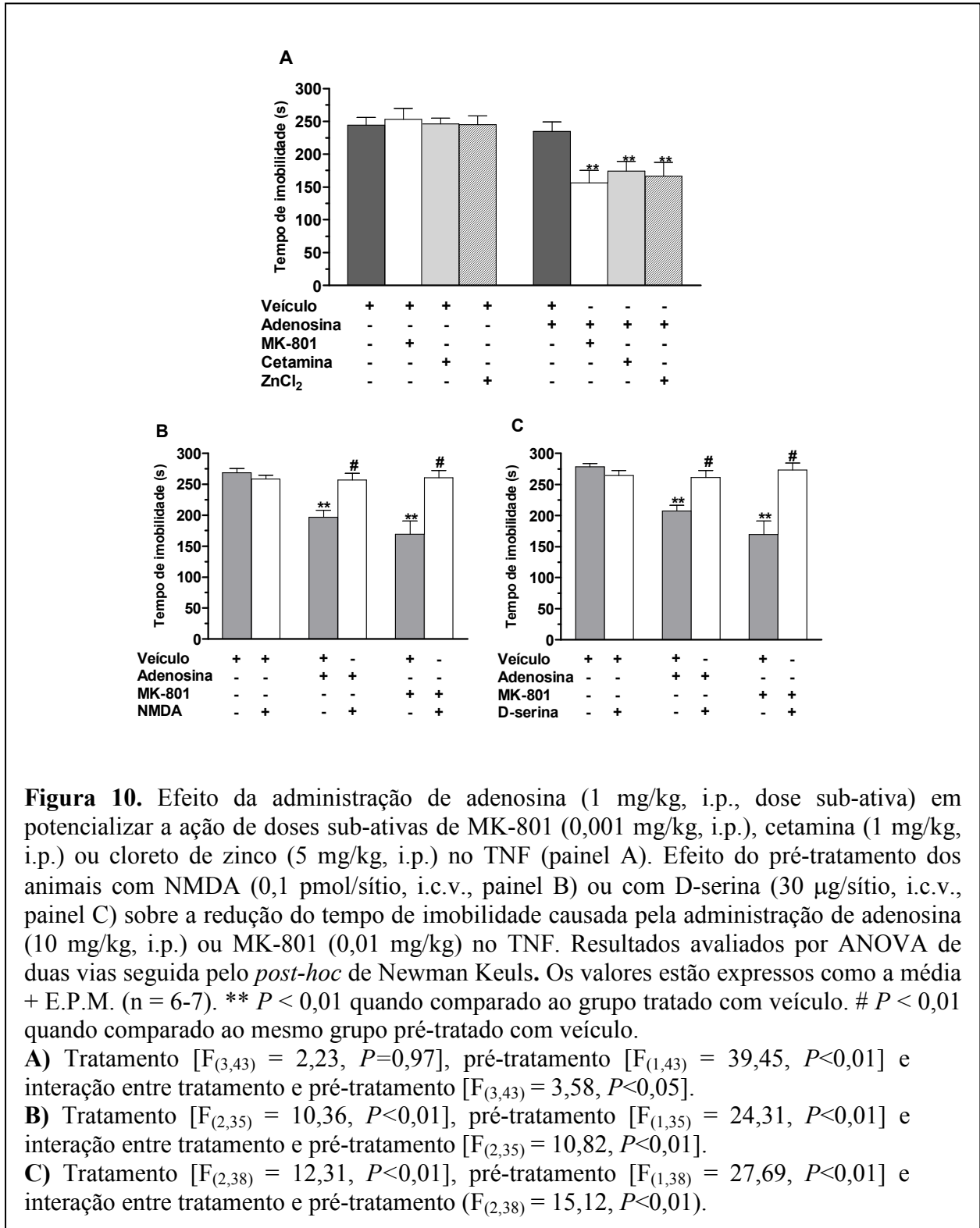
A **Figura 9A** mostra que a administração de adenosina (10 mg/kg, i.p.) produziu uma redução no tempo de imobilidade dos animais do TNF, indicativo de um efeito antidepressivo. O efeito da adenosina foi evidente 30, 60, 120 e 240 minutos após sua administração. A **Figura 9B** mostra que o tratamento dos animais com o inibidor da captação de adenosina dipiridamol (0,5-2 µg/sítio, i.c.v.) produziu uma redução no tempo de imobilidade no TNF. Os resultados apresentados na **Figura 9C** demonstram que a administração de adenosina (5 e 10 mg/kg, i.p.) por 14 dias não foi efetiva em produzir um efeito antidepressivo no TNF, 24 horas após a última administração.



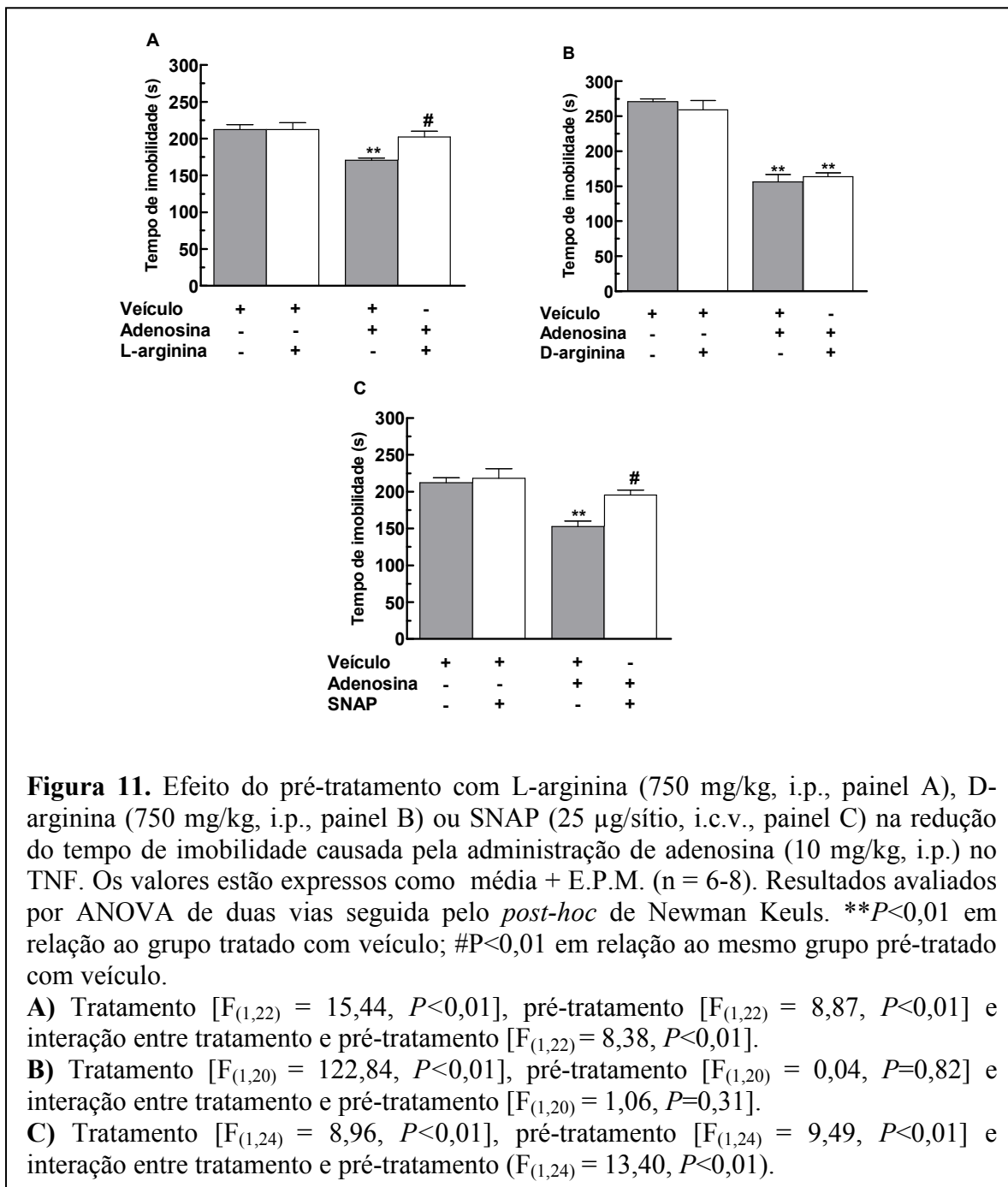
2.2. O efeito antidepressivo da adenosina no TNF foi dependente de uma inibição de receptores NMDA e da via da L-arginina-NO

A **Figura 10** mostra que a administração de uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.) produz um efeito sinérgico com doses sub-ativas de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou cloreto de zinco (5 mg/kg, i.p.) no TNF (**painel A**). O pré-tratamento dos animais com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v., agonista de receptores

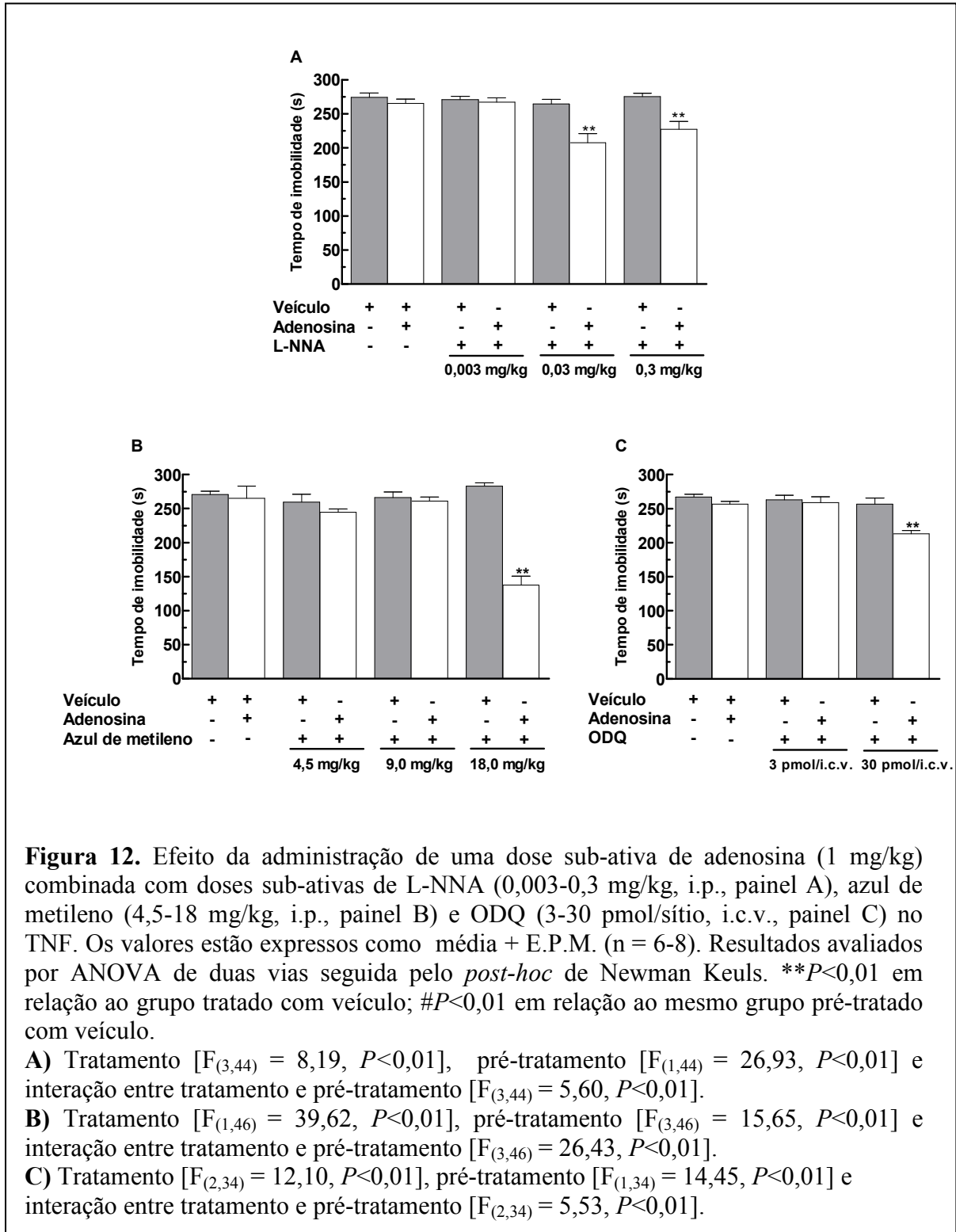
NMDA, **painel B**) ou com D-serina (30 µg/sítio, i.c.v., co-agonista de receptores NMDA, **painel C**) preveniu o efeito da administração de uma dose ativa de adenosina (10 mg/kg, i.p.) ou de MK-801 (0,01 mg/kg, i.p., agonista de receptores NMDA utilizado como controle positivo) no TNF.



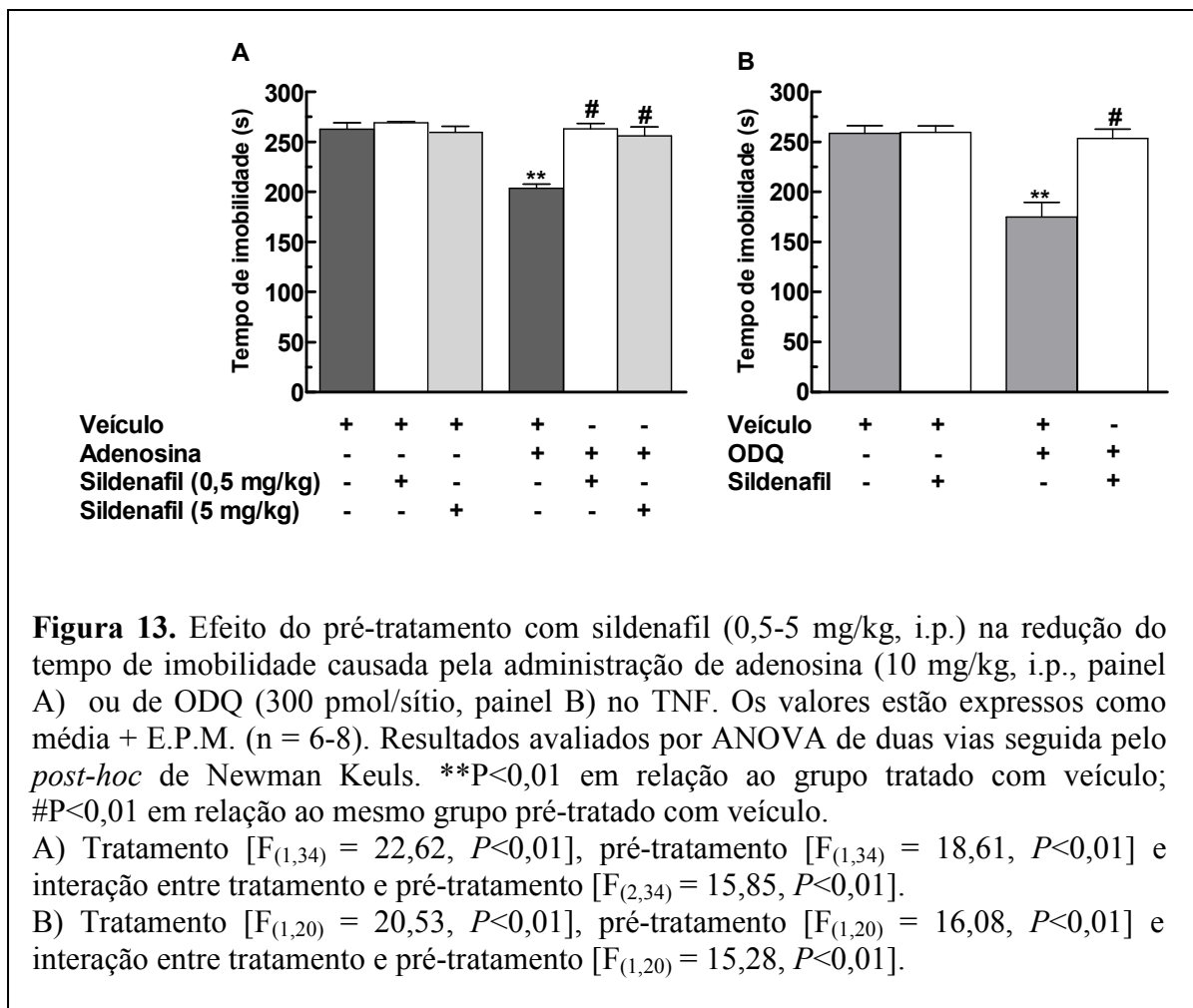
Os resultados apresentados na **Figura 11** mostram que o pré-tratamento dos animais com L-arginina (750 mg/kg, i.p., aminoácido precursor de NO, **painel A**) ou com S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP; 25 µg/sítio, i.c.v., um doador de NO, **painel C**), mas não com D-arginina (750 mg/kg, i.p., isômero inativo da L-arginina, **painel B**) foi capaz de prevenir a redução no tempo de imobilidade causada pela adenosina no TNF.



A **Figura 12** mostra que a administração de uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.) produz um efeito sinérgico com o L-NNA (0,03 e 0,3 mg/kg, i.p., inibidor da NOS, **painel A**), azul de metileno (18 mg/kg, i.p., inibidor da NOS e da GC, **painel B**) e ODQ (30 pmol/sítio, i.c.v., inibidor específico da enzima GC, **painel C**).



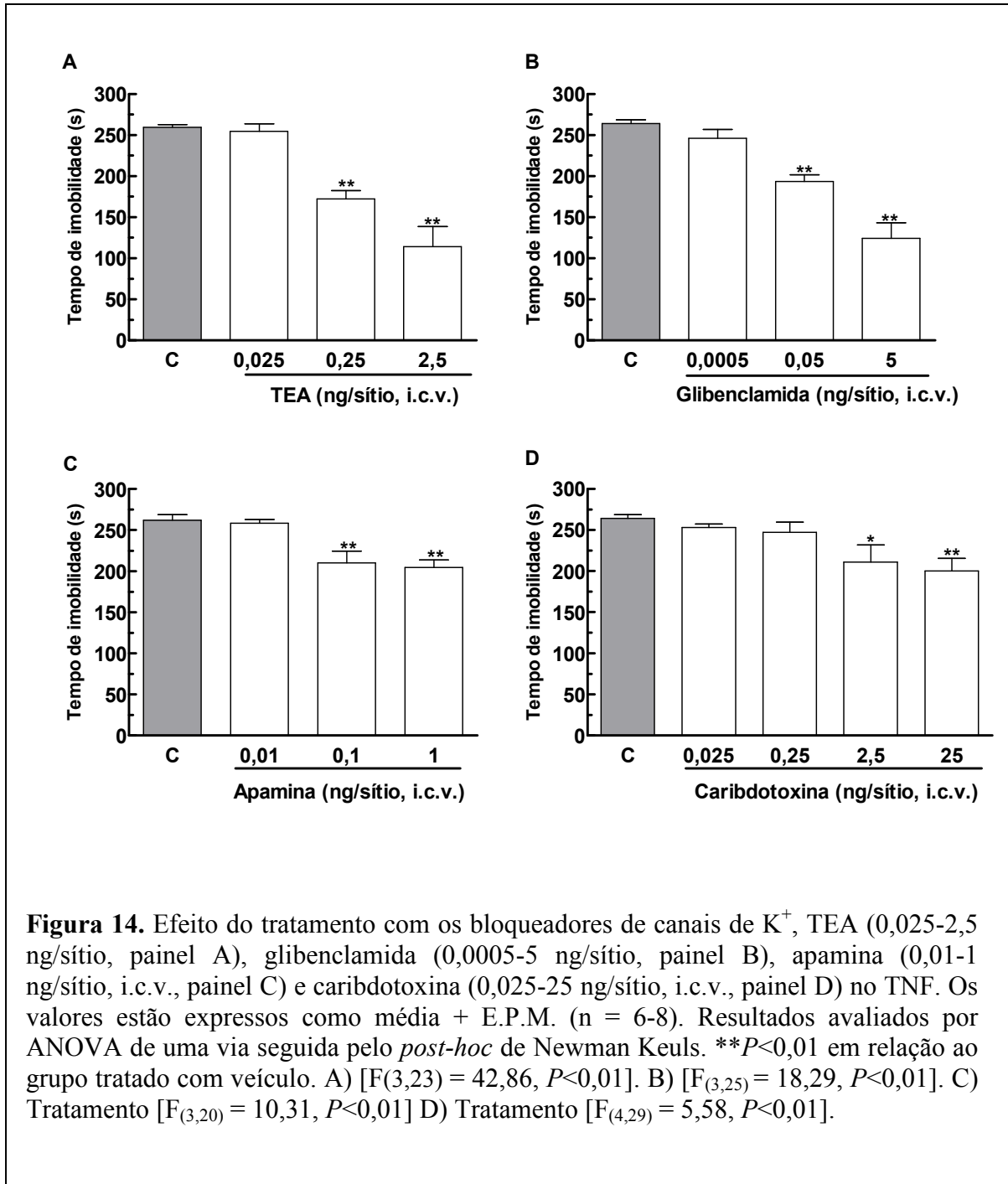
A **Figura 13** mostra que o pré-tratamento dos animais com sildenafil (5 mg/kg, i.p., inibidor da enzima fosfodiesterase tipo 5, PDE-V, **painel A**) não produziu efeito no TNF *per se* mas foi capaz de prevenir o efeito antidepressivo da adenosina (10 mg/kg, i.p.) e do ODQ (300 pmol/sítio, **painel B**) no TNF.



2.2. Envolvimento dos canais de K⁺ no efeito antidepressivo da adenosina no TNF

Os resultados da **Figura 14** mostram que a administração dos bloqueadores de canais de potássio, TEA (0,025 ng/sítio, bloqueador não específico de canais de K⁺, **painel A**), glibenclamida (0,5 pg/sítio, bloqueador de canais de K⁺ sensíveis ao ATP, **painel B**), apamina (10 pg/sítio, i.c.v., bloqueador de canais de K⁺ de baixa condutância

ativados por cálcio, **painel C**) ou caribdotoxina (0,025 ng/sítio, bloqueador de canais de K^+ de alta e média condutância ativados por cálcio, **painel D**) produziu um efeito antidepressivo no TNF.



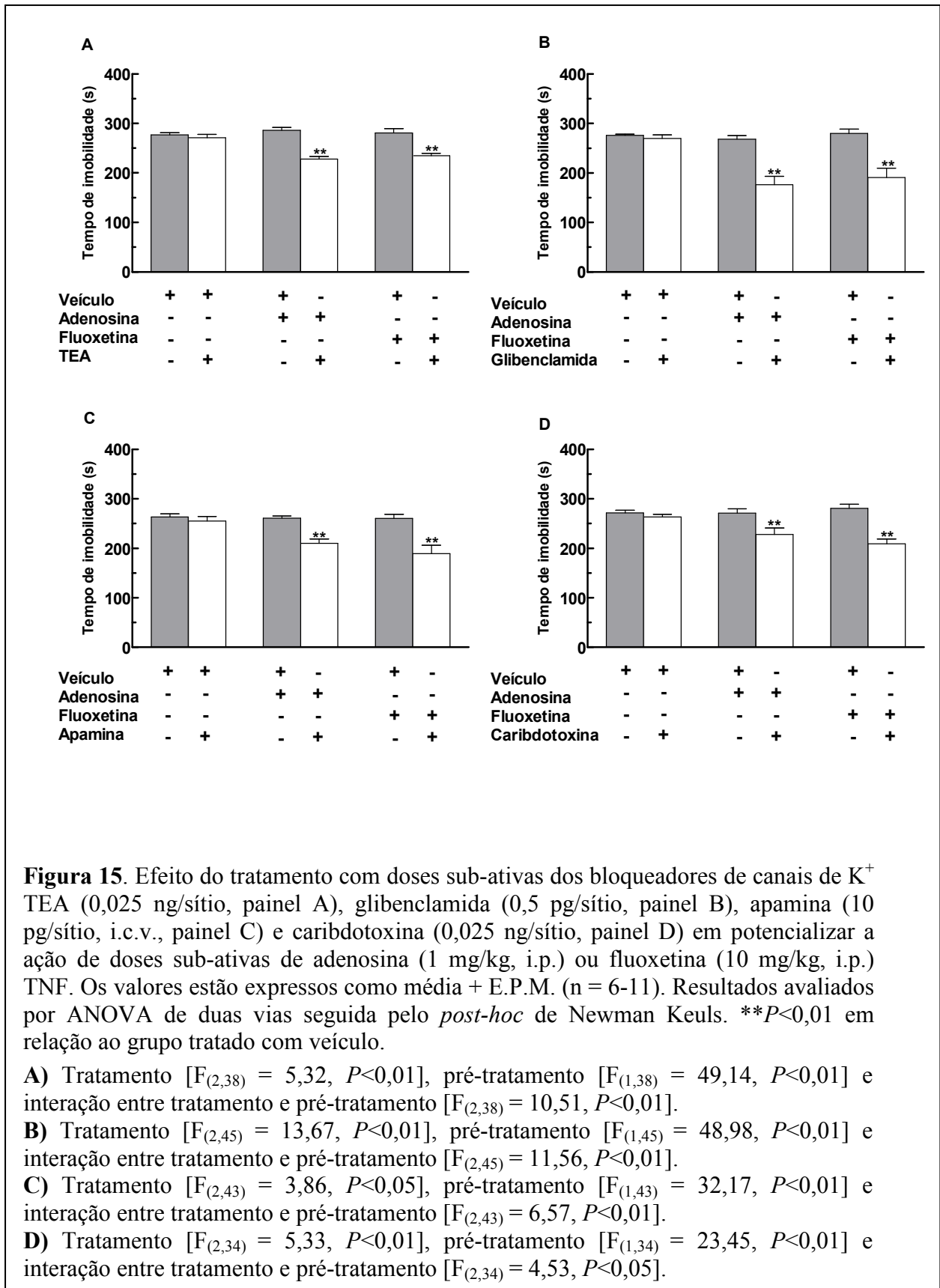
A **Tabela 3** mostra que a administração dos bloqueadores de canais de potássio, TEA (2,5 ng/sítio), glibenclamida (5 ng/sítio), apamina (1 ng/sítio, i.c.v.) ou caribdotoxina (25 ng/sítio) não alterou a atividade locomotora no teste do campo aberto.

Tabela 3. Efeito do tratamento dos animais com inibidores de canais de K⁺ no teste do campo aberto.

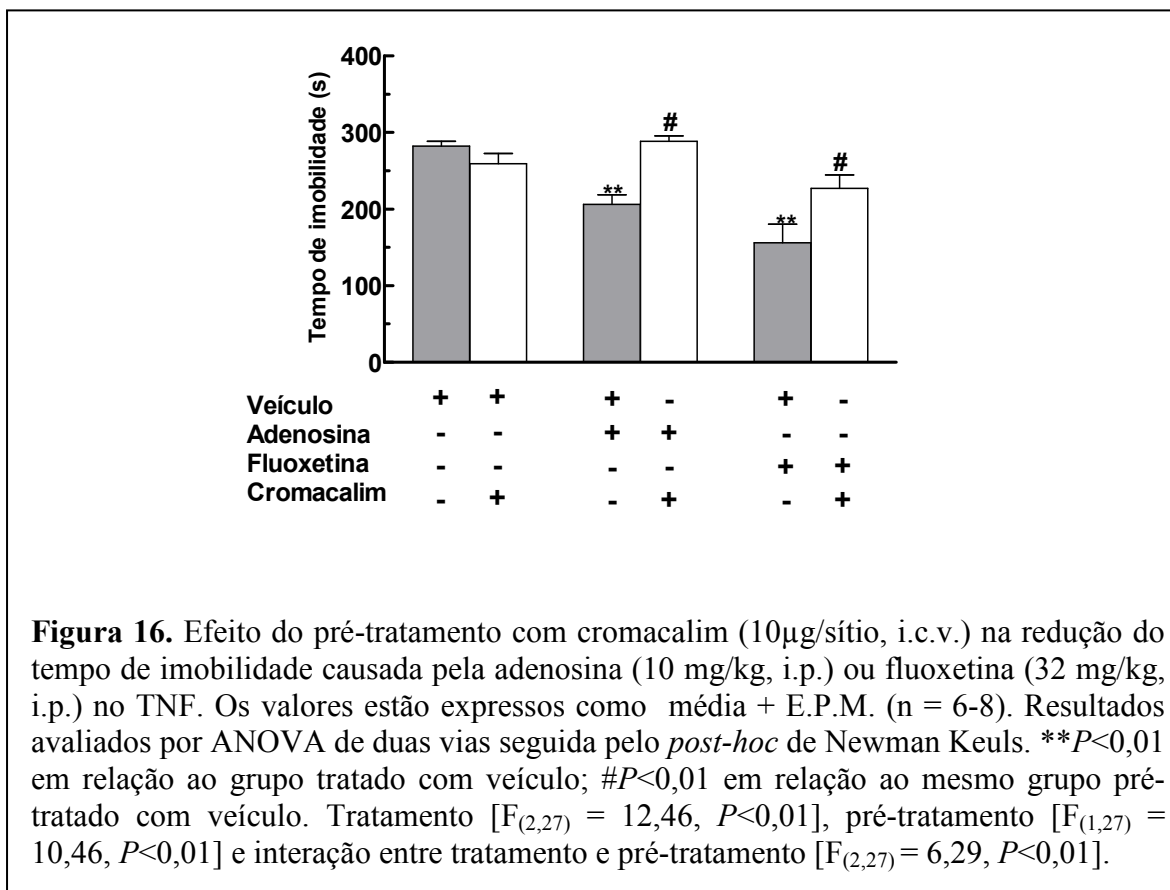
Tratamento	Número de cruzamentos
Salina	98,00 ± 6,19
Tetraetilamônio (TEA)	102,80 ± 7,12
Glibenclamida	97,94 ± 2,54
Caribdotoxina	94,00 ± 9,38
Apamina	71,50 ± 10,25

Efeito do tratamento dos animais com TEA (2,5 ng/sítio, i.c.v.), glibenclamida (5 ng/sítio, i.c.v.), caribdotoxina (25 ng/sítio, i.c.v.) ou apamina (1 ng/sítio, i.c.v.) no número de cruzamentos no teste do campo aberto

Os resultados da **Figura 15** mostram que o tratamento dos animais com doses sub-ativas de TEA (0,025 ng/sítio, **painel A**), glibenclamida (0,5 pg/sítio, **painel B**), apamina (10 pg/sítio, **painel C**) e caribdotoxina (0,025 ng/sítio, **painel D**) potencializou o efeito de uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.) ou fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) no TNF.



Conforme demonstrado na **Figura 16**, o pré-tratamento dos animais com o ativador de canais de K⁺ cromacalim (10 µg/sítio, i.c.v.) preveniu o efeito da adenosina e da fluoxetina no TNF.



A **Figura 17** mostra que o pré-tratamento dos animais com L-arginina (750 mg/kg, i.p., **painel A**) ou com sildenafil (5 mg/kg, i.p., **painel B**) previne o efeito antidepressivo dos bloqueadores de canais de potássio, TEA (2,5 ng/sítio), glibenclamida (5 ng/sítio), apamina (1 ng/sítio, i.c.v.) ou caribdotoxina (25 ng/sítio) no TNF.

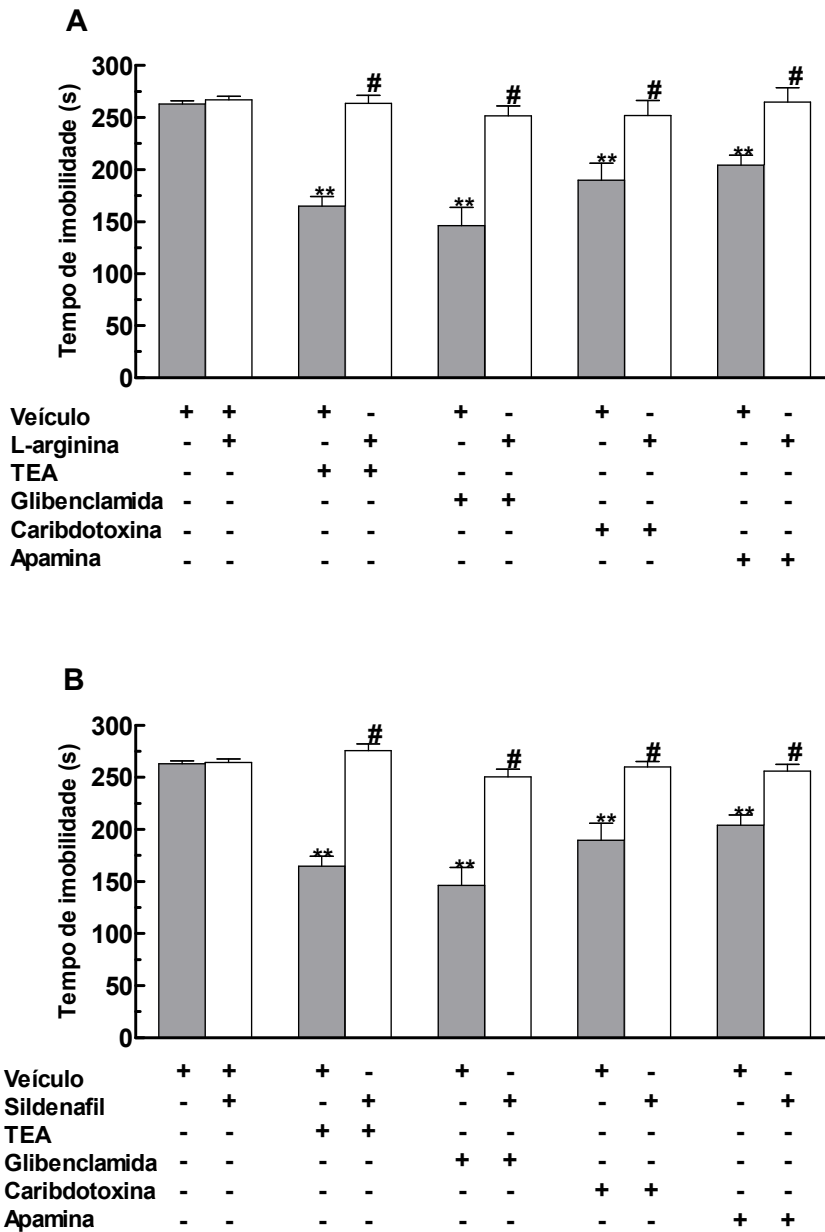


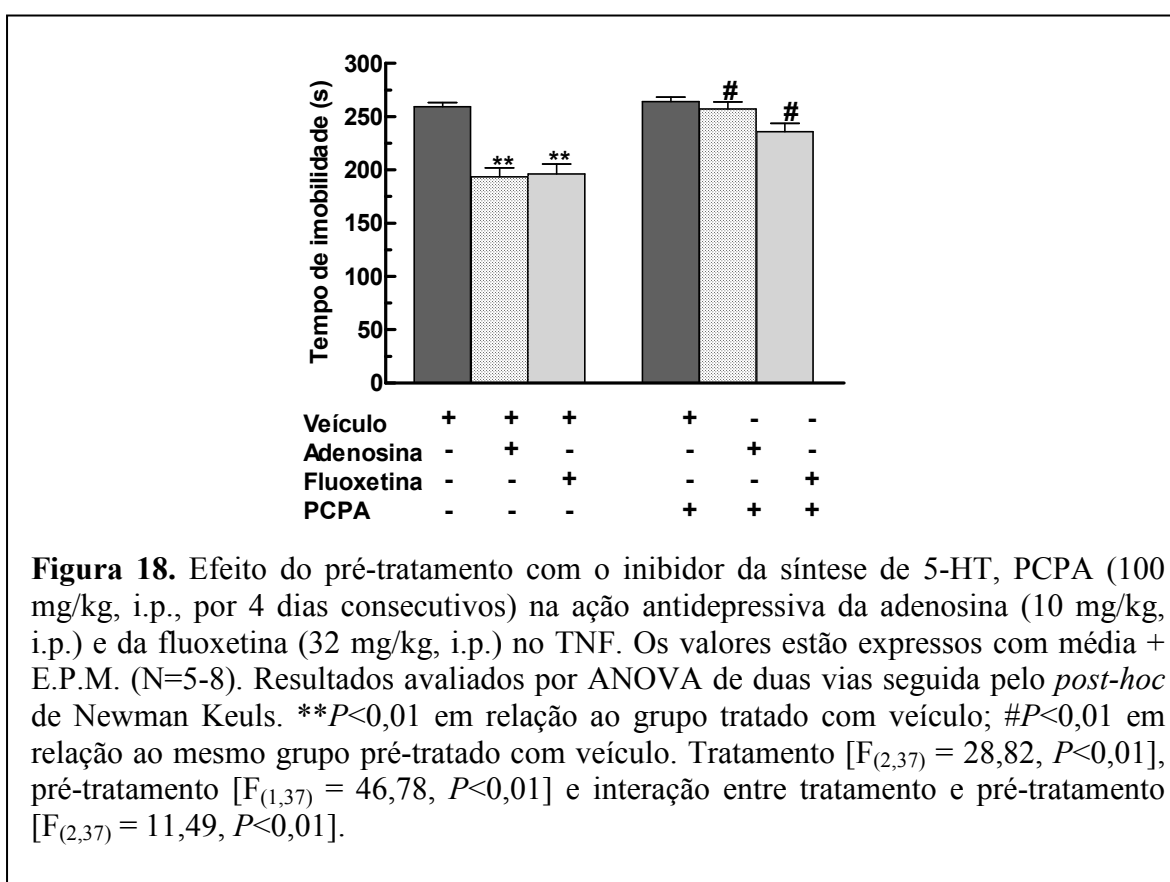
Figura 17. Efeito do pré-tratamento com L-arginina (750 mg/kg, i.p., painel A) ou sildenafil (5 mg/kg, i.p.) na redução do tempo de imobilidade causada pelos bloqueadores de canais de potássio, TEA (2,5 ng/sítio, i.c.v.), glibenclamida (5 ng/sítio, i.c.v.), apamina (1 ng/sítio, i.c.v.) e caribdotoxina (25 ng/sítio, i.c.v.) no TNF. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n = 6-10). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. ** $P < 0,01$ em relação ao grupo tratado com veículo; # $P < 0,01$ em relação ao mesmo grupo pré-tratado com veículo.

A) Tratamento [$F_{(4,64)} = 13,18, P < 0,01$], pré-tratamento [$F_{(1,64)} = 93,49, P < 0,01$] e interação entre tratamento e pré-tratamento [$F_{(4,64)} = 8,62, P < 0,01$].

B) Tratamento [$F_{(4,63)} = 14,63, P < 0,01$], pré-tratamento [$F_{(1,63)} = 122,59, P < 0,01$] e interação entre tratamento e pré-tratamento [$F_{(4,63)} = 12,87, P < 0,01$].

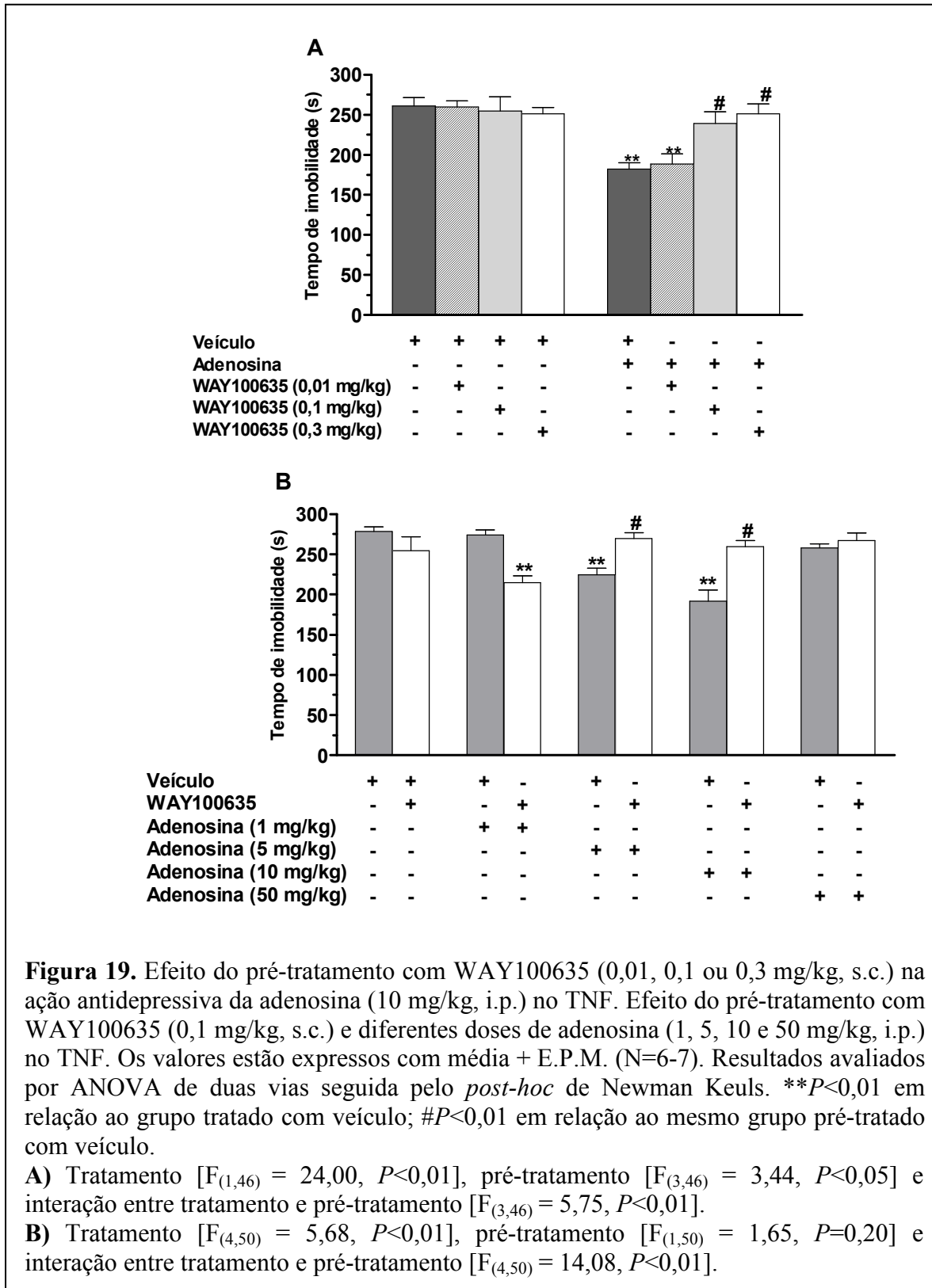
2.3. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo da adenosina no TNF

A **Figura 18** mostra que o pré-tratamento com p-clorofenilalanina metil-éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., inibidor da síntese de 5-HT) por quatro dias consecutivos foi efetivo em prevenir o efeito antidepressivo da adenosina (10 mg/kg, i.p.) e da fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no TNF.

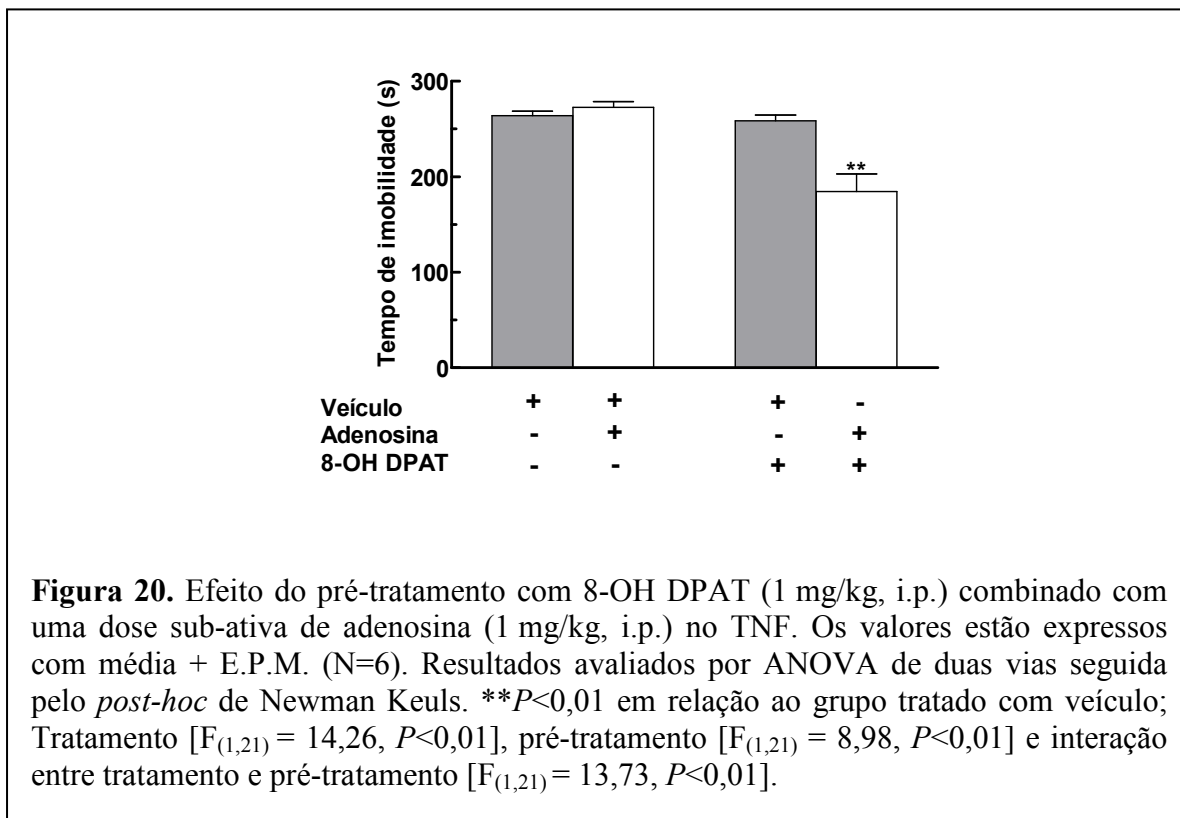


Os resultados da **Figura 19A** mostram o efeito do pré-tratamento com diferentes doses de WAY100635 (0,01; 0,1 ou 0,3 mg/kg, s.c.) na ação antidepressiva da adenosina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. Nas doses de 0,1 e 0,3 mg/kg, antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635, foi efetivo em prevenir o efeito antidepressivo da adenosina no TNF. A Figura 19B mostra a interação entre WAY100635 (0,1 mg/kg,

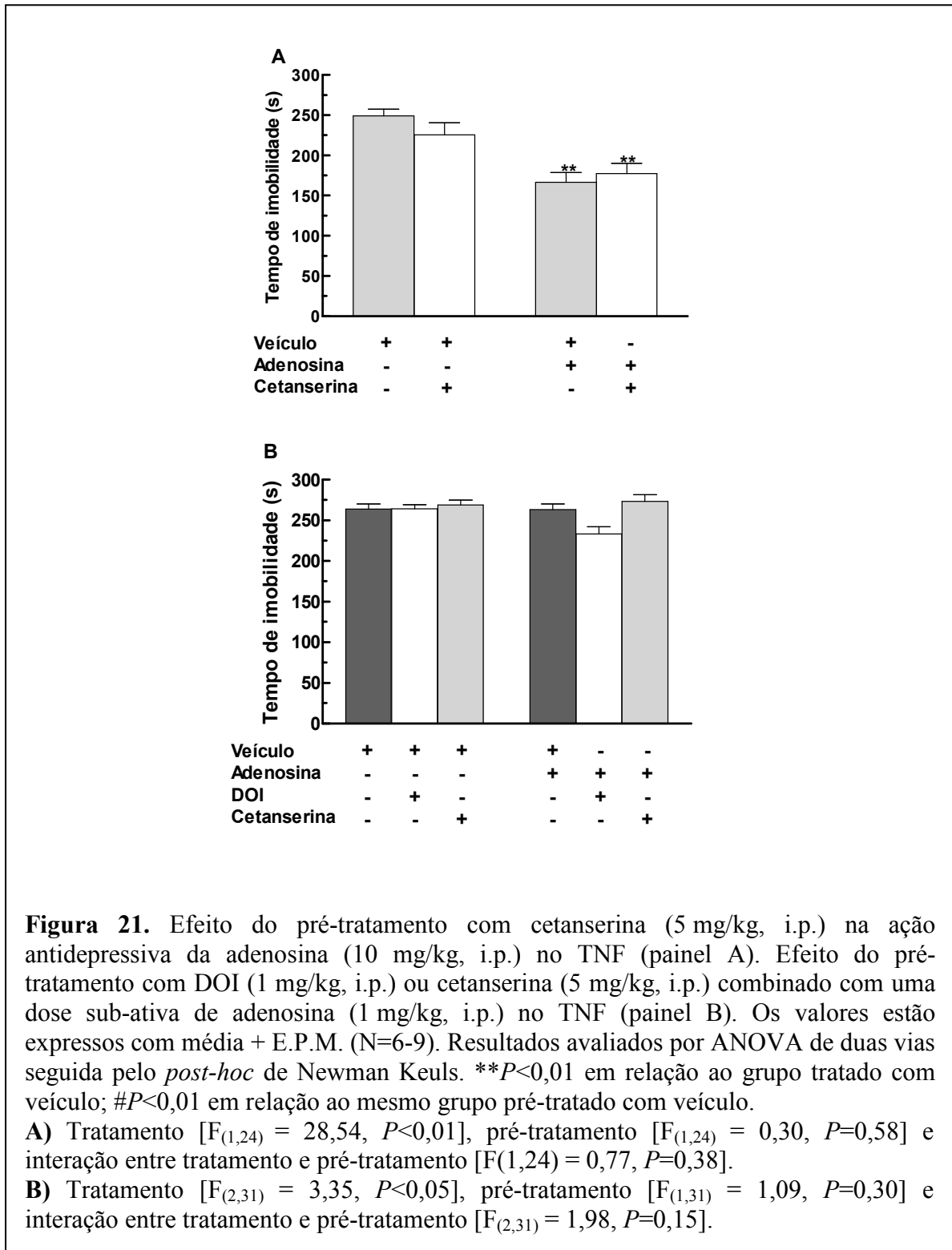
s.c.) e diferentes doses de adenosina (1; 5; 10 e 50 mg/kg, i.p.) no TNF. O pré-tratamento com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c.) potencializou o efeito de uma dose subativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.) no TNF. Por outro lado, este antagonista foi capaz de prevenir o efeito antidepressivo de doses ativas de adenosina (5 e 10 mg/kg, i.p.) no TNF.



A **Figura 20** mostra que a administração de uma dose sub-ativa de 8-OH DPAT (1 mg/kg, i.p., agonista de receptores 5-HT_{1A}) potencializa a ação de uma dose subativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.) no TNF.

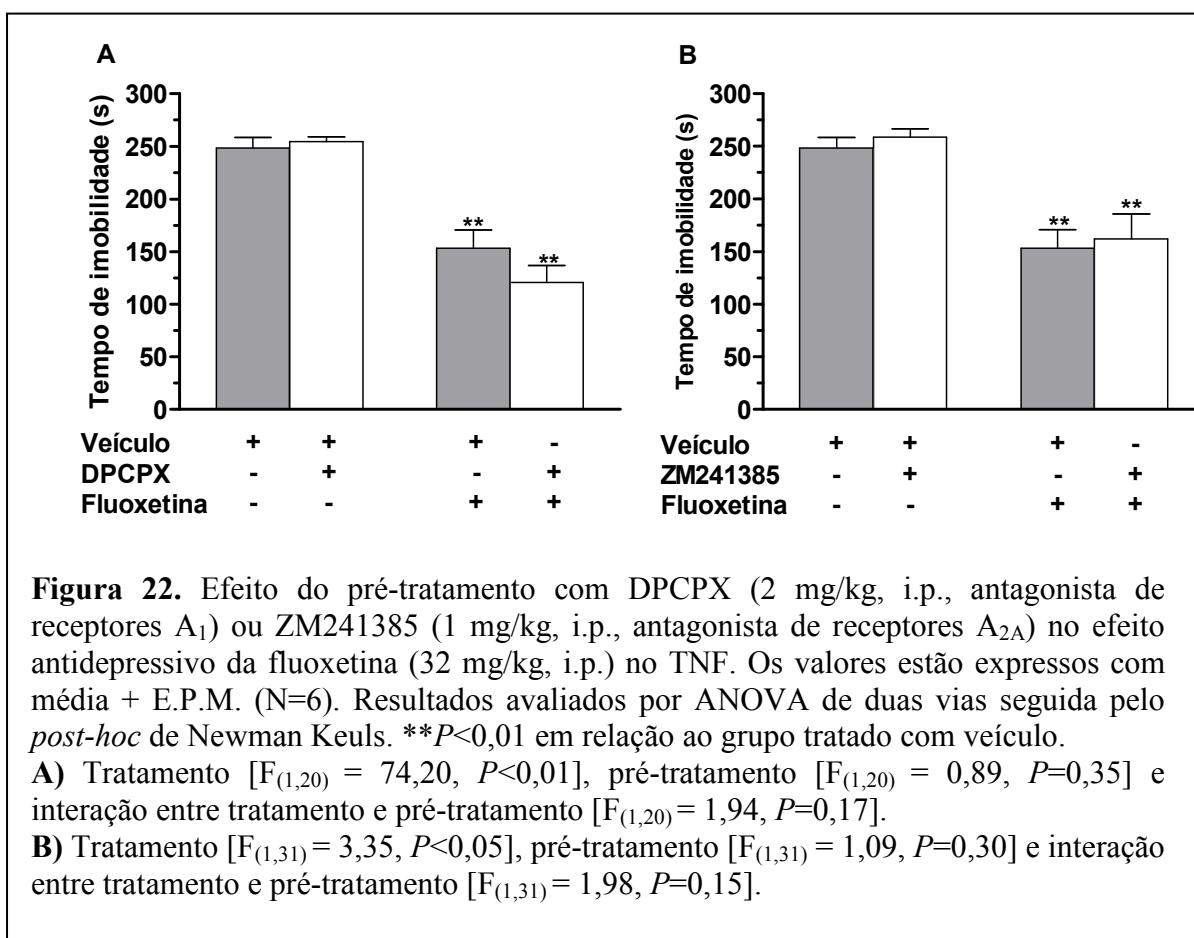


A **Figura 21** mostra que o pré-tratamento com cetanserina (5 mg/kg, i.p., antagonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}, **painel A**) não foi efetivo em prevenir o efeito antidepressivo da adenosina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. A **Figura 21B** mostra que o pré-tratamento com DOI (1 mg/kg, i.p., agonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}) ou cetanserina (5 mg/kg, i.p.) não potencializou o efeito de uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.) no TNF.



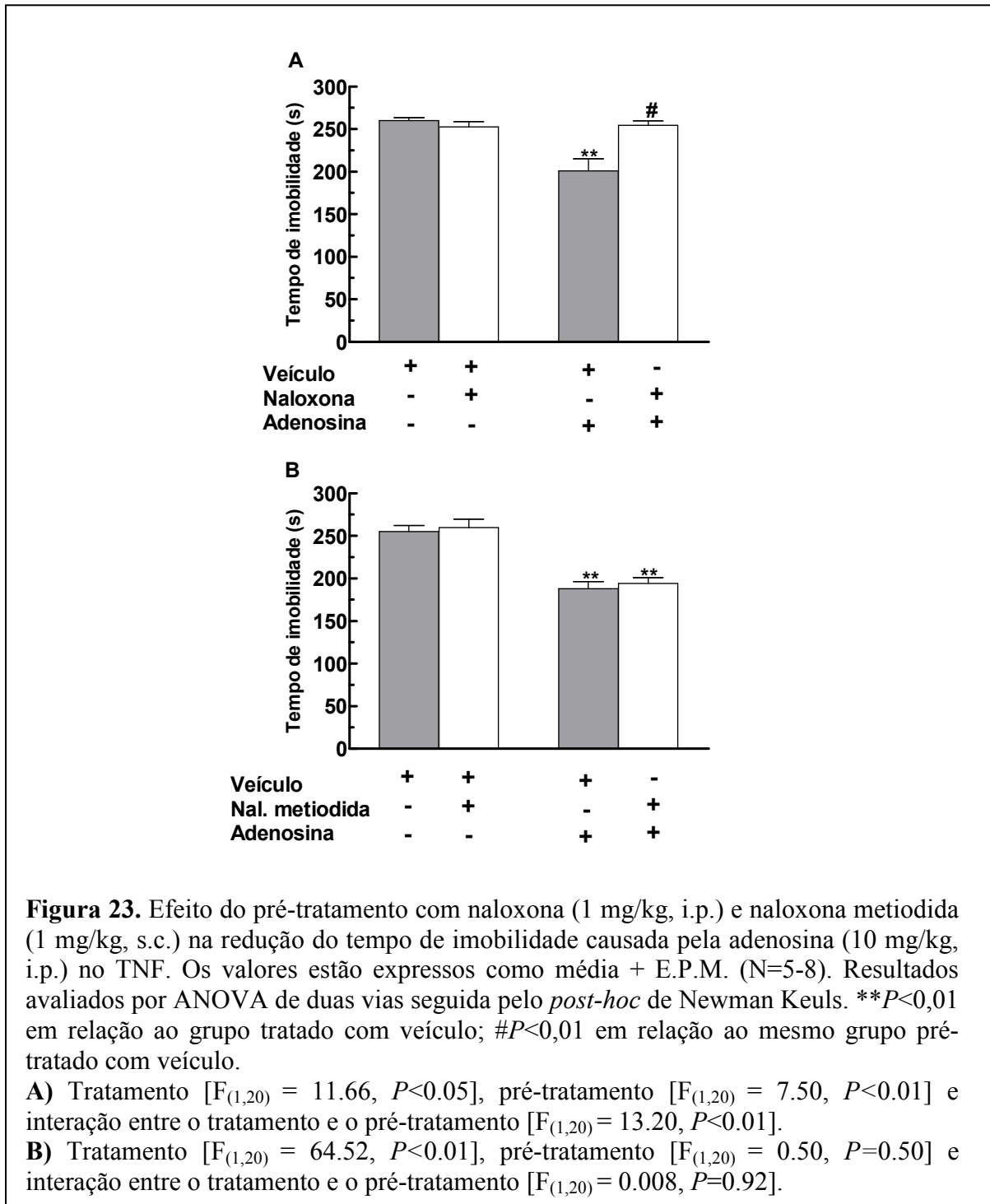
A **Figura 22** mostra que o pré-tratamento com DPCPX (2 mg/kg, i.p., antagonista de receptores A_1 , painel A) ou ZM241385 (1 mg/kg, i.p., antagonista de

receptores A_{2A}, painel B) não foi efetivo em prevenir o efeito antidepressivo da fluoxetina (32 mg/kg, i.p.) no TNF.

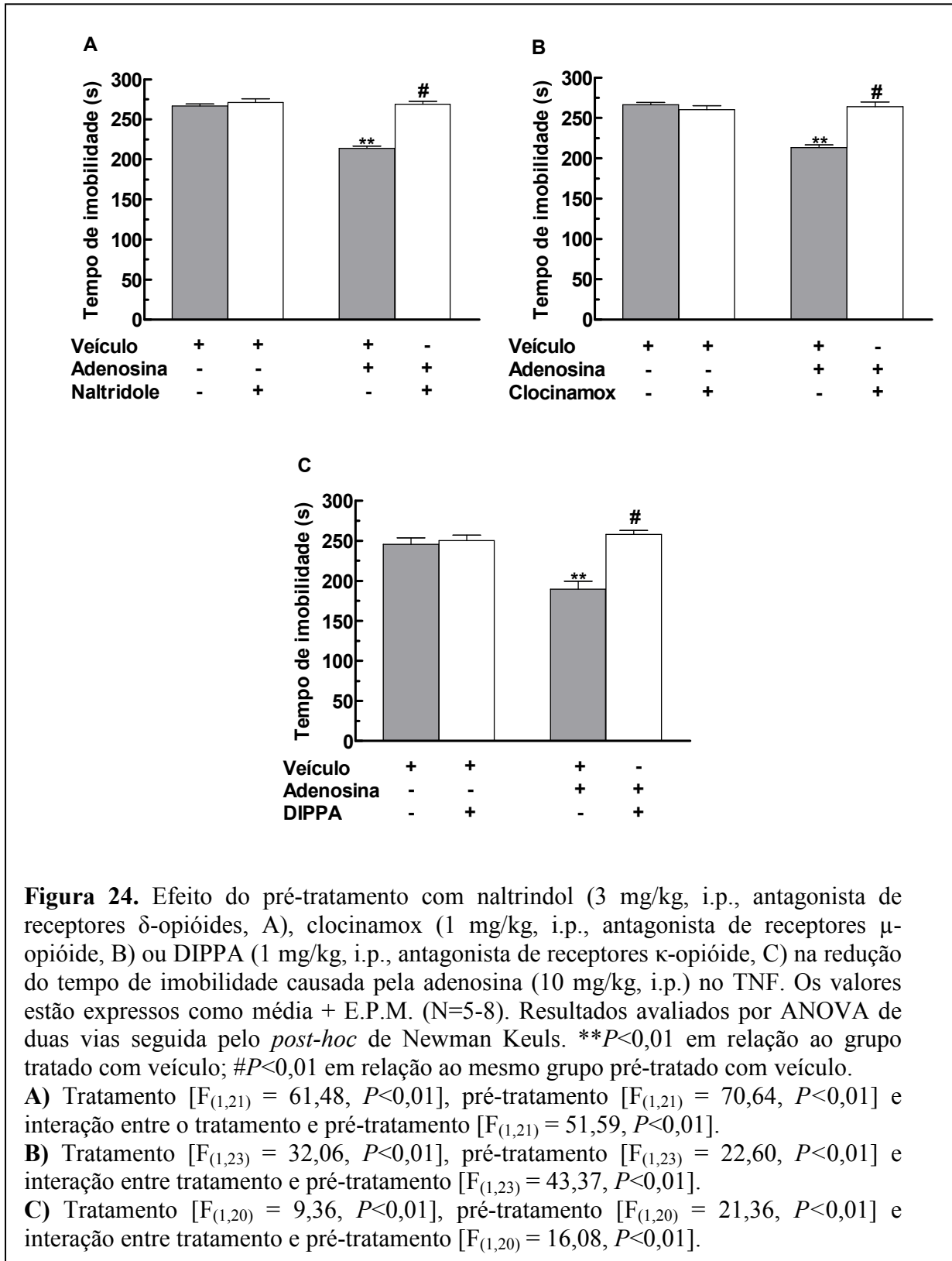


2.4. Envolvimento dos receptores opióides no efeito antidepressivo da adenosina no TNF

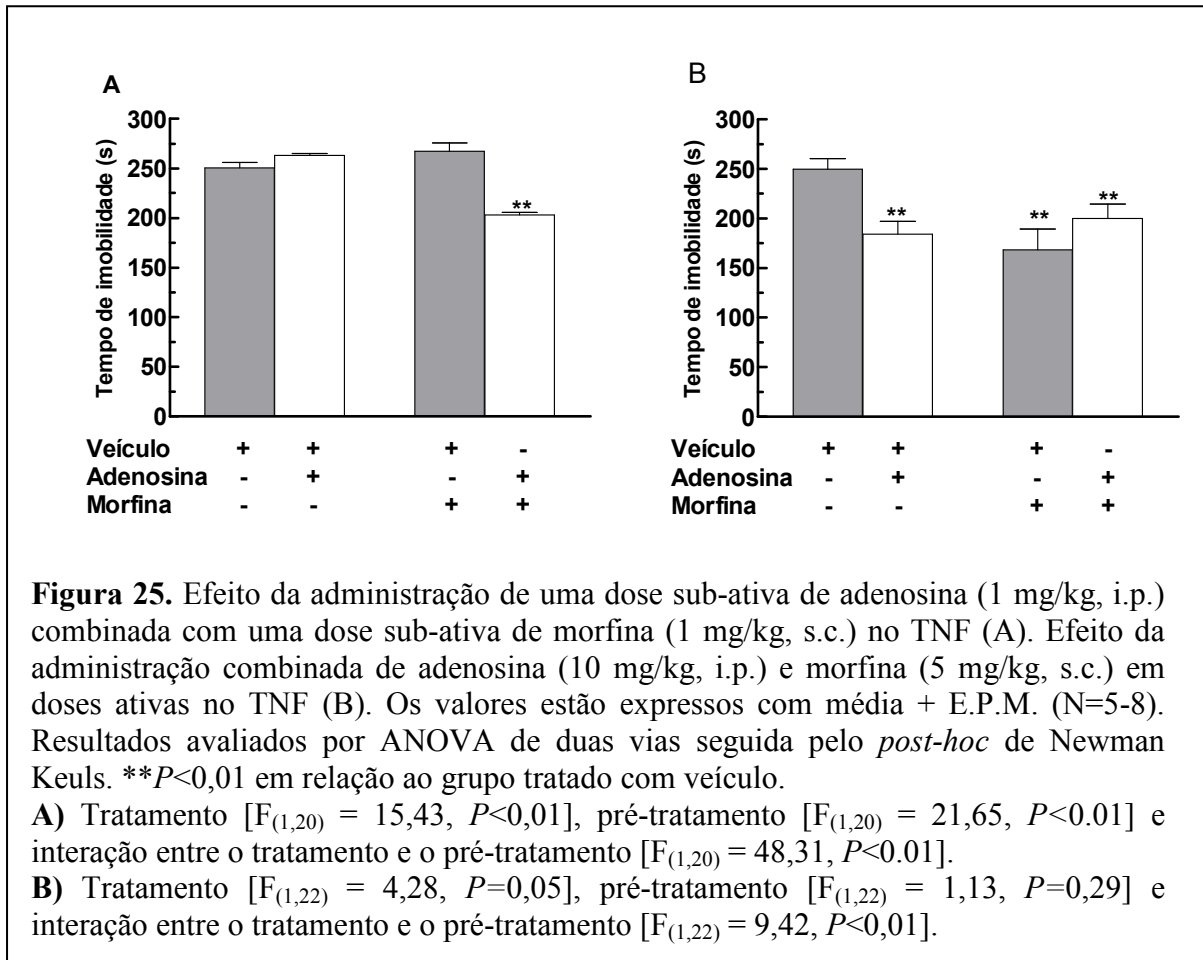
Os resultados da **Figura 23** mostram o efeito do pré-tratamento dos animais com o antagonista não seletivo de receptores opióides, naloxona (1 mg/kg, i.p., **painel A**), naloxona metiodida (1 mg/kg, s.c., análogo da naloxona que não ultrapassa a barreira hematoencefálica, **painel B**) na redução do tempo de imobilidade causada pela adenosina (10 mg/kg, i.p.) no TNF.



Os resultados da **Figura 24** mostram que o pré-tratamento dos animais com naltrindol (3 mg/kg, i.p., antagonista de receptores δ -opióides, **painel A**), clocinnamox (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores μ -opióide, **painel B**) ou DIPPA (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores κ -opióide, **painel C**) preveniu o efeito antidepressivo da adenosina (10 mg/kg, i.p.) no TNF.



Os resultados da **Figura 25A** mostram que o tratamento dos animais com uma dose sub-ativa de adenosina (1 mg/kg, i.p.) produziu um efeito sinérgico com a morfina (1 mg/kg, s.c.) no TNF. A **Figura 25B** mostra que a administração combinada de doses ativas de adenosina (10 mg/kg, i.p.) e morfina (5 mg/kg, s.c.) não produziu um efeito aditivo no TNF.



3. Discussão

3.1 Efeito antidepressivo da adenosina no TNF

Conforme anteriormente demonstrado por nosso grupo, a administração aguda de adenosina produz um efeito antidepressivo no TNF (Kaster et al., 2004). O TNF é um modelo experimental que têm sido amplamente utilizado na pesquisa de compostos

com potencial ação antidepressiva, tendo em vista que a grande maioria das classes de antidepressivos reduz o tempo de imobilidade neste teste (Porsolt et al., 1977).

O papel da adenosina na modulação do humor está de acordo com a capacidade do sistema adenosinérgico em atuar como controlador de vários sistemas com papel chave na etiopatologia da depressão como na liberação de 5-HT (Okada et al., 2001), de CRH e cortisol/corticosterona (Chau et al., 1999; Geiger e Glavin, 1985; Nicholson et al., 1989; Chen et al., 2008), além de atuar controlando a excitabilidade neuronal no hipocampo (Fredholm et al., 2005), uma região chave no controle do eixo HPA e intimamente relacionada aos sintomas da depressão (Revisado por Cunha et al., 2008). Várias evidências sugerem ainda que antidepressivos tricíclicos e outras terapias efetivas no tratamento da depressão, como a terapia eletroconvulsiva e a privação de sono, estão associadas com um aumento na liberação de adenosina (Phillis et al., 1982; 1984; Van Calker e Biber, 2005).

Contudo, outros estudos descrevem que o bloqueio dos receptores A_{2A} produz um efeito antidepressivo no TNF. A administração aguda de cafeína, antagonista não seletivo de receptores adenosinérgicos, também já foi relacionada a um efeito antidepressivo no TNF (Sarges et al., 1990; El Yacoubi et al., 2001; 2003). No entanto, as doses utilizadas tanto de cafeína quanto de outros antagonistas de receptores de adenosina aumentam a atividade locomotora dos animais, deixando a possibilidade do efeito observado no TNF não ser específico (Williams, 1989; Sarges et al., 1990; El Yacoubi et al., 2001; 2003; Rodrigues et al., 2005). Além disso, a administração aguda de cafeína em doses que não alteram a atividade locomotora não apresenta efeito antidepressivo no TNF (Sarges et al., 1990; Enríquez-Castillo et al., 2008).

Neste trabalho, a redução no tempo de imobilidade causada pela adenosina no TNF foi efetiva até 4 horas após sua administração. Está bem estabelecido que a

adenosina apresenta uma meia-vida curta (cerca de 30 segundos no plasma), e sua administração sistêmica produz efeitos cardiovasculares, incluindo redução da taxa cardíaca, da pressão sanguínea e temperatura corporal (Barraco et al., 1987; Evoniuk et al., 1987). Assim, alguns efeitos observados neste estudo podem ser atribuídos a ações periféricas, contudo nas doses administradas não observamos efeito na temperatura corporal ou mesmo na atividade locomotora dos animais (Kaster et al., 2004). Além disso, alguns efeitos podem ser atribuídos a ação de metabólitos como o AMP ou a inosina. De fato, a administração de inosina também é efetiva em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TNF e no TSC, um efeito que tem início 30 minutos após a administração sistêmica e dura até 6 horas (dados não mostrados). Apesar do curto tempo de meia-vida, muitos efeitos são observados após administração sistêmica de adenosina, incluindo efeito ansiolítico (Prediger et al., 2006), alteração na locomoção (Singh e Kulkarni, 2002) e ação anticonvulsivante (Akula et al., 2007). Por outro lado, demonstramos que a administração intracerebroventricular de dipiridamol, inibidor da captação de adenosina, também é efetiva em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TNF, sugerindo que os efeitos observados pela administração sistêmica de adenosina são semelhantes aos efeitos produzidos pela administração central de adenosina (Kaster et al., 2004), ou mesmo pelo aumento nos níveis extracelulares resultante da inibição dos transportadores de nucleosídeos centrais.

Além disso, demonstramos que o tratamento com adenosina por 14 dias não apresentou qualquer efeito no TNF. Muitos autores sugerem que os efeitos da adenosina administrada sistemicamente são semelhantes aos efeitos da administração de agonistas A_1 (Barraco et al., 1987; Evoniuk et al., 1987; Webb et al., 1990; Bonizzoni et al., 1995). No entanto, apesar do seu conhecido efeito neuroprotetor, a ativação prolongada de receptores A_1 , leva a sua dessensibilização e ao aumento na expressão dos receptores

A_{2A} (Cunha et al., 2005). Assim, podemos sugerir que a ação antidepressiva mediada pela administração sistêmica de adenosina no TNF é semelhante ao efeito observado pelo aumento dos níveis centrais deste nucleosídeo. Contudo, o efeito da adenosina é evidente apenas após a administração aguda, o que nos leva a sugerir um maior envolvimento dos receptores A₁ em relação aos A_{2A}.

3.2. Envolvimento dos receptores NMDA e da via da L-arginina-NO

De fato, um grande número de evidências tem associado a depressão maior a uma disfunção na sinalização glutamatérgica, especialmente alterações nos receptores NMDA (Sanacora, 2005). Neste estudo, o envolvimento dos receptores NMDA na ação antidepressiva da adenosina no TNF é evidenciado por alguns conjuntos de evidências. A administração de compostos que antagonizam a ação de receptores NMDA como MK-801, cetamina e cloreto de zinco foi capaz de potencializar o efeito de uma dose sub-ativa de adenosina. O MK-801 e a cetamina ligam-se a um sítio dentro do canal, chamado sítio de ligação à fenciclidina, bloqueando de maneira não competitiva os receptores NMDA. O cloreto de zinco por sua vez, liga-se principalmente em um sítio localizado na sub-unidade NR1/NR2A dos receptores NMDA e pode promover um bloqueio da corrente que varia de 40% a 80% (Chen et al., 1997; Paoletti et al., 1997; Low et al., 2000; Herin e Aizenman, 2004).

Uma segunda evidência que sugere que ação da adenosina no TNF é dependente de uma inibição dos receptores NMDA, é o fato da administração do agonista NMDA e do co-agonista D-serina, que ativam estes receptores, prevenir seu efeito antidepressivo. Além disso, a administração de NMDA e D-serina foi efetiva em prevenir o efeito do antagonista não-competitivo de receptores NMDA, MK-801, composto que possui atividade antidepressiva bem estabelecida em diversos modelos animais no TNF (Papp e Moryl, 1994; Skolnick, 1999; Kugaya e Sanacora, 2005). A D-serina é formada

através da conversão do seu isômero L-serina por ação da enzima serina racemase. Esta enzima está presente tanto em nerônios quanto em astrócitos e sua inibição está relacionada a proteção contra danos excitotóxicos, convulsão e isquemia (Sanacora, 2005). O aumento nos níveis de D-serina está envolvido em processos de neurodegeneração crônica e coopera com o glutamato na hiperativação de receptores NMDA, associada à neuroinflamação e à doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica (Sasabe et al., 2007, Wu et al., 2007).

A modulação do receptor NMDA torna-se extremamente importante a medida que o aumento exacerbado nos níveis intracelulares de Ca^{2+} gera excitotoxicidade, e desencadeia uma série de fenômenos que a levam à morte celular, como a ativação de lipases e proteases citoplasmáticas, despolarização da membrana mitocondrial (Dessi et al., 1993), inibição da síntese de ATP e aumento da formação de radicais livres (Nicholls, 1985; Dykens, 1994; Gunter et al., 1994; Dugan et al., 1995; Reynolds e Hastings, 1995; Bindokas et al., 1996). Modelos animais de depressão induzida pelo estresse crônico ou pela bulbectomia olfatória causam um aumento na liberação de glutamato no hipocampo (Sanacora et al., 2008). Além disso, uma expressão reduzida nos transportadores de glutamato foi encontrada em estudos *post mortem* no cérebro de pacientes com depressão maior, sugerindo que um aumento na função glutamatérgica estaria associado aos distúrbios na homeostasia cerebral e processos patológicos encontrados na depressão (Sanacora et al., 2008).

Desta forma, o efeito agudo da adenosina no TNF parece ser dependente da inibição dos receptores NMDA. Os receptores A_1 e A_{2A} estão co-localizados nos terminais glutamatérgicos no hipocampo e modulam a transmissão excitatória de maneira oposta. A ativação pré e pós-sináptica de receptores A_1 de adenosina diminui a liberação de glutamato e hiperpolariza a membrana celular inibindo os receptores

NMDA (De Mendonça et al., 2000). Por outro lado, a ativação dos receptores A_{2A} tem um efeito estimulatório na transmissão glutamatérgica, causando um aumento na liberação de glutamato e ativação de receptores NMDA. Contudo, conforme discutido anteriormente, os efeitos sistêmicos da adenosina parecem principalmente mediados pelos receptores A_1 , visto que são semelhantes aos efeitos da administração de agonistas A_1 (Barraco et al., 1987; Evoniuk et al., 1987; Webb et al., 1990; Bonizzoni et al., 1995). Vale ressaltar, no entanto, que a administração aguda tanto do agonista de receptores A_1 como o agonista de receptores A_{2A} (CHA e DPMA, respectivamente) foi capaz de produzir um efeito antidepressivo agudo no TNF, semelhante ao observado com a administração de adenosina (Kaster et al., 2004). A ativação de receptores A_{2A} está relacionada com a ativação das vias glutamatérgicas, principalmente por aumento da liberação de glutamato (De Mendonça et al., 2000), contudo alguns trabalhos relatam que a ativação de receptores A_{2A} em neurônios estriatais pode causar inibição de correntes mediadas por receptores NMDA (Gerevich et al., 2002), levantando a possibilidade do envolvimento dos receptores adenosinérgicos A_{2A} , além dos receptores A_1 no efeito antidepressivo da adenosina administrada agudamente. Além disso, antagonistas de receptores NMDA como a memantina e o MK-801 aumentam o RNAm para A_{2A} em algumas regiões do encéfalo (Marvanová e Wong, 2003).

Assim, nossos dados sugerem que os efeitos da administração sistêmica de adenosina no TNF são mediados por uma inibição dos receptores NMDA, corroborando dados da literatura que demonstram que antidepressivos como a fluoxetina e a desipramina, em concentrações clinicamente relevantes, inibem os receptores NMDA (Szasz et al., 2007). Além disso, antagonistas de receptores NMDA possuem propriedades antidepressivas (Skolnick, 1999) e são capazes de potencializar a atividade de antidepressivos como a fluoxetina, venlafaxina e imipramina (Rogoz et al., 2002).

Este estudo também investigou o envolvimento da via da L-arginina-NO no efeito antidepressivo da adenosina. No cérebro, o NO é produzido principalmente em estruturas pós-sinápticas como resposta à ativação de receptores NMDA (Denninger e Marletta, 1999). Por ser uma espécie reativa, o NO reage com um série de moléculas, como o Fe^{2+} presente nos grupamentos heme de muitas proteínas (Rogers e Ignarro, 1992). O NO pode ainda nitrosilar grupamentos tióis presentes nas proteínas (Stamler et al., 1992; Montague et al., 1994), causando modificações em sua estrutura e conformação e acarretando mudanças na sua atividade e na suscetibilidade à degradação (Castro et al., 1994). Além disso, um dos seus derivados mais reativos é o peroxinitrito ($ONOO^-$), formado por sua reação com o ânion superóxido e considerado um dos principais efetores de morte celular induzida por NO (Dawson et al., 1993).

A inibição da produção de NO exerce efeitos semelhantes aos efeitos dos antagonistas de receptores NMDA e potencializa a ação de antidepressivos (Harkin et al., 2004). Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com o aminoácido precursor de NO, L-arginina, ou com SNAP, um doador de NO preveniu significativamente o efeito antidepressivo da adenosina no TNF. Além disso, a adenosina apresentou um efeito sinérgico com L-NNA, azul de metileno e ODQ. O L-NNA é um análogo da L-arginina que age como um inibidor competitivo da enzima NOS, reduzindo assim os níveis de NO. O azul de metileno, por sua vez, inibe tanto a NOS quanto a GC, e o ODQ age especificamente inibindo a enzima GC e reduzindo os níveis de GMPc. Estes resultados indicam que o efeito antidepressivo da adenosina parece ser dependente, pelo menos em parte, da inibição da síntese de NO, podendo ainda ser um efeito indireto da inibição de receptores NMDA, o que está de acordo com os dados da literatura que mostram que inibidores da NOS têm propriedades antidepressivas em modelos animais (Harkin et al., 1999; Yildiz et al., 2000; Da Silva et

al., 2000; Harkin et al., 2003, Volke et al., 2003; Heiberg et al., 2002) e são capazes de prevenir o efeito antidepressivo do MK-801, demonstrando uma relação direta entre a inibição dos receptores NMDA e da síntese de NO e um efeito antidepressivo no TNF (Dhir e Kulkarni, 2008). Além disso, uma série de estudos demonstram ainda uma ligação entre a síntese de NO e o sistema serotoninérgico. A administração de inibidores da NOS aumenta a liberação de 5-HT hipocampal (Wegener et al., 2000), diminui o *turnover* de 5-HT no córtex frontal e hipocampo (Karolewicz et al., 2001; Chiavegatto et al., 2001), aumenta os níveis de 5-HT e da enzima triptofano hidroxilase do giro denteado (Park et al. 2004), além de potencializar o efeito de inibidores da recaptação de 5-HT no TNF (Harkin et al., 2004).

3.3. Envolvimento dos canais de K⁺

O envolvimento dos canais de potássio na modulação do humor também tem sido sugerido em diversos estudos. Nossos dados demonstram que a administração dos inibidores de canais de K⁺, TEA (inibidor de canais de potássio dependentes de voltagem), glibenclamida (inibidor de canais de potássio sensíveis a ATP), caribdotoxina (inibidor de canais de potássio de alta condutância modulados por cálcio) e apamina (inibidor de canais de K⁺ de baixa e média condutância modulados por cálcio) produz um efeito antidepressivo no TNF, sem alterar a atividade locomotora dos animais no campo aberto. Nossos dados corroboram dados da literatura que demonstram que inibidores de canais de potássio apresentam efeito antidepressivo no TNF em camundongos, além de potencializar o efeito de antidepressivos clássicos. Por outro lado, agentes que promovem abertura dos canais de K⁺ causam efeito depressogênico (Guo et al., 1996; Galeotti et al., 1999).

No cérebro, a abertura de canais de K^+ leva a uma hiperpolarização, redução na liberação de neurotransmissores e na excitabilidade neuronal. Foi recentemente demonstrado que camundongos com depleção genética dos canais de K^+ de baixa condutância apresentam um aumento na neurotransmissão serotoninérgica e dopaminérgica e um conseqüente comportamento tipo antidepressivo em modelos animais de depressão (Jacobsen et al., 2008). Além disso, a depleção genética dos canais de K^+ de dois poros produziu um efeito antidepressivo em cinco modelos animais diferentes, além de uma melhor resposta a administração aguda e crônica de antidepressivos (Heurteaux et al., 2008). Um trabalho recente sugere ainda que o tratamento crônico com inibidores seletivos da recaptação de 5-HT reduz a ativação de receptores $5-HT_{1A}$ não por causar uma diminuição em sua expressão, mas por reduzir a expressão de canais de K^+ ativados por subunidades de proteínas G e funcionalmente acoplados a estes receptores. Assim, McGehee (2007) propõe que a ação desta classe de antidepressivos parece envolver uma redução do tônus inibitório que ocorre pela ativação de vários receptores metabotrópicos funcionalmente acoplados a este tipo de canais de K^+ .

No presente estudo, o efeito antidepressivo da adenosina no TNF parece ser dependente de uma interação com canais de potássio, uma vez que a administração de doses subativas dos inibidores de canais de K^+ , TEA, glibenclamida, caribdotoxina e apamina potencializou o efeito de doses subativas de adenosina e de fluoxetina no TNF. Alguns estudos mostram uma relação entre canais de K^+ e adenosina. Foi sugerido que os canais de K_{ATP} são funcionalmente acoplados aos receptores A_1 presentes nos terminais colinérgicos no hipocampo de rato (Sperlágh et al., 2001). Além disso, a adenosina agindo em receptores A_1 e A_3 é capaz de provocar uma internalização dos canais de K^+ dependentes de ATP, mantendo assim a excitabilidade neuronal (Hu et al.,

2003). Contudo, a via da L-arginina-NO-GMPc também é capaz de ativar canais de K^+ . Demonstramos que o pré-tratamento dos animais com L-arginina ou sildenafil é capaz de prevenir o efeito dos inibidores de canais de K^+ no TNF. Desta maneira, o NO produzido em estruturas pós-sinápticas pode atuar ativando canais de K^+ , diretamente ou através da produção de GMPc, inibindo assim a excitabilidade neuronal. Além disso, o NO é capaz de difundir-se e agir em canais de K^+ pré-sinápticos, causando uma hiperpolarização e inibição da liberação de diversos neurotransmissores. Assim, o efeito da adenosina em potencializar a ação de bloqueadores de canais de K^+ também pode ser dependente de uma ação indireta, causada pela inibição dos receptores NMDA e da via da L-arginina-NO.

3.4. Envolvimento do sistema serotoninérgico

O sistema serotoninérgico está intimamente relacionado com a patofisiologia da depressão, principalmente pelo fato dos fármacos antidepressivos utilizados atualmente atuarem aumentando os níveis de 5-HT na fenda sináptica. No entanto, a relação entre o tratamento com antidepressivos e o sistema serotoninérgico é complexa, e além do bloqueio da recaptação de 5-HT, envolve também uma interação com diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos (Millan et al., 2006).

Os nossos resultados sugerem que o efeito antidepressivo da adenosina parece estar envolvido com o sistema serotoninérgico, uma vez que a depleção da 5-HT, através da administração de PCPA preveniu completamente a redução na imobilidade causada pela adenosina e pela fluoxetina no TNF. O PCPA é um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, e sua administração, por quatro dias consecutivos, causa uma depleção de aproximadamente 60% nos níveis de 5-HT endógena em camundongos (Redrobe et al., 1998). Considerando que o PCPA age pré-sinápticamente (Luscombe et

al., 1993), podemos concluir que a adenosina necessita de uma maquinaria serotoninérgica pré-sináptica intacta, contudo não podemos descartar a possibilidade de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos estarem mediando este efeito.

Neste estudo, o 8-OH-DPAT, um agonista de receptores 5-HT_{1A}, produziu um efeito sinérgico com a adenosina no TNF. Trabalhos anteriores demonstraram que a administração de 8-OH-DPAT reduz o tempo de imobilidade em ratos (O'Neill, 2001; De Vry et al., 2004) e potencializa o efeito de antidepressivos (Redrobe et al., 1996). Contudo, a depleção da 5-HT endógena com o tratamento com PCPA não previne o efeito antidepressivo do 8-OH-DPAT, sugerindo que este composto exerce sua ação por ativar receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos (De Vry et al., 2004).

O antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, WAY100635 preveniu o efeito de doses ativas de adenosina no TNF. Contudo, quando administrado em doses baixas, o WAY100635 não apresentou efeito *per se*, mas foi capaz de produzir um efeito sinérgico com doses sub-ativas de adenosina (1 mg/kg). A administração de WAY100635 foi capaz de deslocar a curva dose-resposta da adenosina para esquerda, um resultado similar foi observado com um efeito sinérgico de doses sub-ativas de fluoxetina e WAY100635 (Rocha et al., 1997). Uma possível explicação poderia estar relacionada aos efeitos deste antagonista seletivo em receptores 5-HT_{1A} pré e pós-sinápticos. O bloqueio de receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos pelo WAY100635 causa um aumento na liberação de 5-HT, e conseqüentemente um efeito sinérgico com a adenosina. Por outro lado, em doses mais altas, o WAY100635 pode atuar como antagonista de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos, levando a uma prevenção dos efeitos antidepressivos da adenosina. No entanto, mais estudos são necessários para a melhor compreensão da interação entre a adenosina e o sistema serotoninérgico.

Apesar dos receptores 5-HT₂ também estarem envolvidos nos transtornos de humor e no mecanismo de ação dos antidepressivos (Borsini, 1995), o pré-tratamento dos animais com o antagonista de receptores 5-HT_{2A/2C}, cetanserina, não foi efetivo em prevenir o efeito antidepressivo da adenosina no TNF. Além disso, administração de cetanserina, ou do agonista preferencial de receptores 5-HT_{2A}, DOI não foi capaz de potencializar o efeito de uma dose sub-ativa de adenosina, sugerindo que o efeito da adenosina no TNF não é mediado por uma interação com receptores 5-HT₂.

Além disso, investigamos o possível envolvimento do sistema adenosinérgico na ação do inibidor seletivo da recaptção de 5-HT, fluoxetina. O pré-tratamento dos animais com os antagonistas seletivos de receptores A₁ e A_{2A}, DPCPX e ZM241385, respectivamente, efetivo em prevenir o efeito da adenosina no TNF (Kaster et al., 2004), não preveniu a redução do tempo de imobilidade causada pela fluoxetina no mesmo teste, sugerindo que a adenosina e a fluoxetina não compartilham de um mecanismo de ação comum.

Assim, a interação da adenosina e do sistema serotoninérgico parece bastante complexa e necessita uma melhor investigação, contudo os resultados aqui apresentados sugerem que este efeito parece ser essencialmente dependente de um aumento na liberação de 5-HT e de sua ação em receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos. A resposta mediada pela adenosina na liberação de neurotransmissores é geralmente dependente de um balanço entre a ativação de receptores A₁ (inibitórios) e A_{2A} (estimulatórios), contudo os efeitos estimulatórios da ativação de receptores A_{2A} são frequentemente mascarados pela ativação de receptores A₁ (Correia-de-Sa et al., 1996; Okada et al., 1997, 1999a,b). Okada e colaboradores (2001) demonstraram que os receptores A₁ são capazes de inibir a liberação de 5-HT, porém o efeito estimulatório da ativação de receptores A_{2A} só é evidente quando os receptores A₁ estão inibidos, tornando pouco

provável que os efeitos observados neste trabalho estejam relacionados a um aumento na liberação de 5-HT mediado por ativação de receptores A_{2A}. Por outro lado, conforme mencionado anteriormente, existe uma próxima relação entre os efeitos de inibidores da NOS e o sistema serotoninérgico, sugerindo que o aumento na liberação central de 5-HT, e conseqüente ativação de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos, pode ser um mecanismo indireto gerado pela inibição dos receptores NMDA e da síntese de NO.

3.5. Envolvimento do sistema opióide

O sistema opióide também tem sido largamente relacionado aos transtornos depressivos. Foram relatados níveis altos de opióides endógenos e de seus receptores principalmente em áreas límbicas envolvidas na regulação do humor (Waksman et al., 1986). Considerando que os opióides endógenos têm sido implicados no mecanismo de ação de antidepressivos (Berrocoso et al., 2004) e que existem evidências de que a adenosina está implicada na modulação da ação dos opióides no SNC (Salem e Hope, 1997), nesta etapa do trabalho investigamos a participação do sistema opióide na mecanismo de ação antidepressiva da adenosina no TNF.

Os resultados deste estudo sugerem que a ação antidepressiva da adenosina pode também estar envolvida com os receptores opióides centrais, uma vez que o pré-tratamento com naloxona, mas não com naloxona metiodida (análogo da naloxona que não ultrapassa a barreira hematoencefálica) foi capaz de prevenir o efeito da adenosina em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TNF. Os receptores A₁ quanto A_{2A} são capazes de modular as ações de opióides no SNC, uma vez que agonistas adenosinérgicos atenuam os sintomas da abstinência de opióides (Kaplan e Sears, 1996; Salem e Hope, 1997). Animais com depleção genética dos receptores A_{2A} apresentam aumento dos sintomas de abstinência gerados pela retirada da morfina (Bailey et al.,

2004). Além disso, o tratamento crônico com opióides aumenta os níveis de receptores A₁ em homogenatos de cérebro total e no córtex (Ahlijanian e Takemori, 1986), sugerindo que mudanças adaptativas nos receptores adenosinérgicos podem estar mediando os sintomas de abstinência gerados pelos opióides (Kaplan et al., 1994). O *binding* do antagonista de receptores A₁, DPCPX, está reduzido no cérebro de animais com depleção genética dos receptores μ -opióide (Bailey et al., 2002).

Neste trabalho, a administração de clocinamox, naltrindol e DIPPA, antagonistas de receptores μ -, δ - e κ -opióide, respectivamente, foi capaz de prevenir o efeito da adenosina no TNF. Além disso, a combinação de doses sub-ativas de adenosina e morfina causa um efeito sinérgico no TNF, sem alterar a atividade locomotora. A morfina aumenta a expressão dos transportadores e o efluxo de adenosina, aumentando assim seus níveis sinápticos (Kaplan e Leite-Morris, 1997). Além disso, tem sido proposto que a adenosina é um dos intermediários envolvidos na antinocicepção produzida pela morfina. As metilxantinas, antagonistas de receptores adenosinérgicos, bloqueiam a ação inibitória da morfina sobre a atividade de neurônios estriatais e corticais (Perkins e Stone, 1980).

Contudo, a inibição dos receptores NMDA está associada a um aumento na liberação de peptídeos opióides (Maze e Fujinaga, 2000). Além disso, o antagonista não seletivo de receptores opióides, naloxona, é capaz de prevenir o efeito de antidepressivos como a venlafaxina e a imipramina no TNF, sugerindo que os efeitos da adenosina no sistema opióide podem ser dependentes do bloqueio dos receptores NMDA ou ainda de uma modulação do sistema serotoninérgico.

3.6. Integração entre os sistemas

O efeito antidepressivo da administração aguda de adenosina parece envolver uma integração com múltiplos sistemas de neurotransmissores. A inibição de receptores NMDA pode representar um alvo de ação primário, visto o bem estabelecido efeito inibitório da adenosina sobre a liberação de glutamato e ativação de receptores NMDA.

A inibição da síntese de NO é um efeito direto da redução na transmissão excitatória, e frequentemente associada a um efeito antidepressivo em modelos animais. Adicionalmente, apesar do NO formado agir essencialmente ativando a GC e elevando os níveis intracelulares de GMPc, a modulação da excitabilidade neuronal pela inibição de canais de K⁺ tanto pelo NO quanto pelo GMPc já está bem estabelecida. Contudo, o NO pode também agir como mensageiro retrógrado, modulando a atividade de proteínas e receptores, a ativação de canais de K⁺ pré-sinápticamente pode estar envolvida em um aumento na liberação de 5-HT e peptídeos opióides. Uma série de estudos demonstram uma ligação entre o NO e o sistema serotoninérgico. A inibição da NOS aumenta a liberação de 5-HT hipocampal, os níveis de 5-HT e da enzima triptofano hidroxilase do giro denteado (Wegener et al., 2000; Park et al. 2004), além de ser capaz de potencializar o efeito de inibidores da recaptção de 5-HT no TNF (Harkin et al., 2004). Camundongos com depleção genética da NOSn apresentam uma hipofunção dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} (Chiavegatto et al. 2001). Além disso, a depleção de 5-HT com a administração de PCPA, inibidor da enzima triptofano hidroxilase, por 14 dias consecutivos, causa um aumento na expressão da NOSn no estriado, córtex frontal e hipocampo de ratos, sugerindo que a expressão da NOSn também parece ser regulada pela 5-HT (Tagliaferro et al. 2003).

Por outro lado, a administração aguda e crônica de citalopram inibe a liberação de glutamato, indicando que ISRS podem influenciar a transmissão excitatória no SNC

(Gołembiowska e Dziubina, 2000). Além disso, o pré-tratamento com PCPA previne completamente o efeito antidepressivo do GMP e do MK-801 no TNF (Eckeli et al., 2000), reforçando a idéia de que o bloqueio de receptores NMDA e a redução na síntese de NO aumenta os níveis de 5-HT e potencializa a ação de compostos que atuam sobre o sistema serotoninérgico.

Recentemente foi também sugerido que a ação final dos antidepressivos parece envolver uma redução do tônus inibitório que ocorre pela ativação de vários receptores metabotrópicos funcionalmente acoplados a canais de K^+ , visto que ISRS reduzem a ativação de receptores $5-HT_{1A}$ não por causar uma diminuição em sua expressão, mas por reduzir a expressão de canais de K^+ ativados por subunidades de proteínas G e funcionalmente acoplados a estes receptores. Além dos receptores $5-HT_{1A}$, muitos outros receptores são capazes de modular este tipo de canais, como receptores opióides e o próprio receptor A_1 de adenosina. Desta maneira, o controle da excitabilidade neuronal pode representar o mecanismo de convergência de vários sistemas envolvidos no efeito da adenosina no TNF (**Figura 26**).

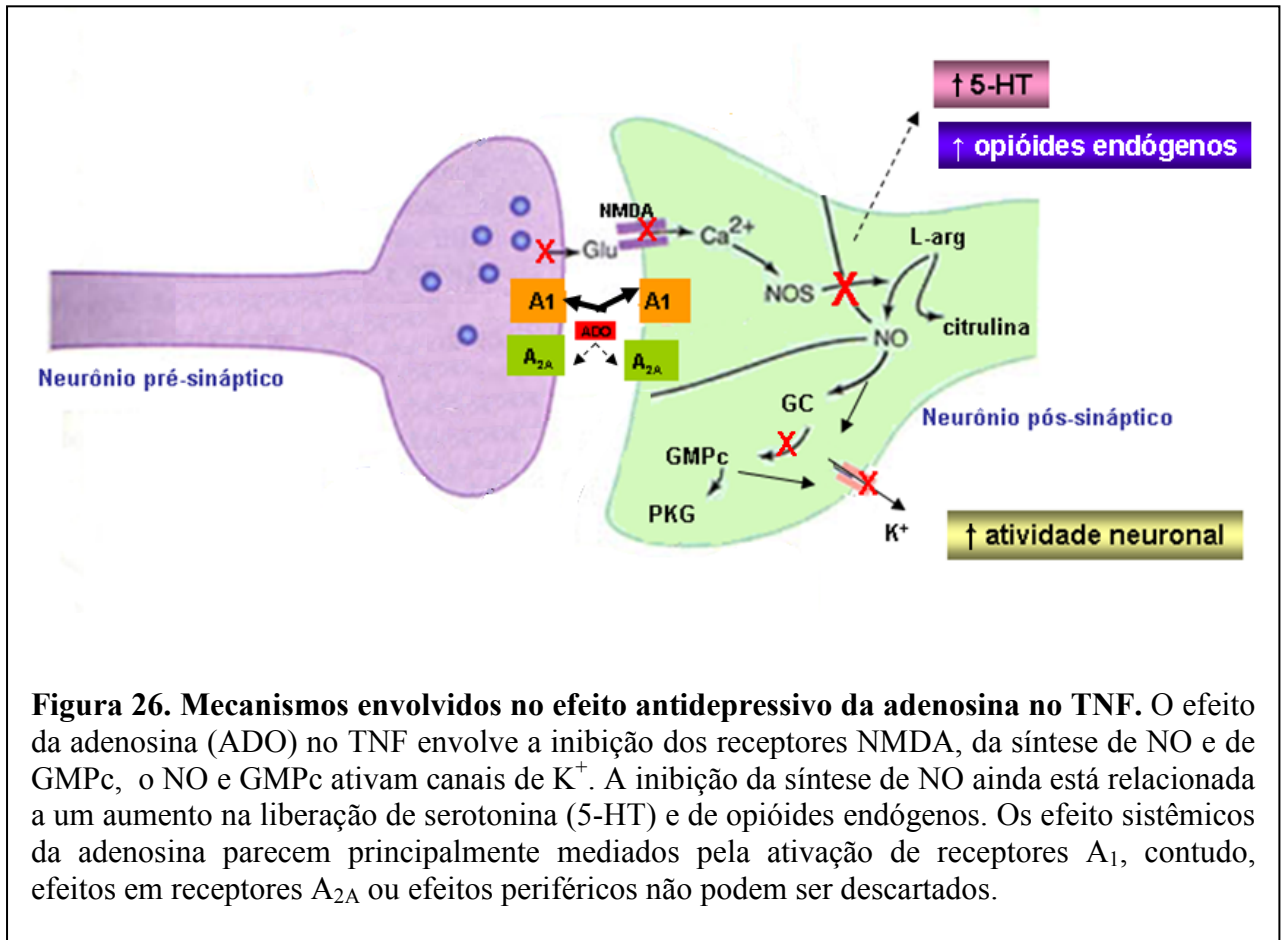


Figura 26. Mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo da adenosina no TNF. O efeito da adenosina (ADO) no TNF envolve a inibição dos receptores NMDA, da síntese de NO e de GMPc, o NO e GMPc ativam canais de K^+ . A inibição da síntese de NO ainda está relacionada a um aumento na liberação de serotonina (5-HT) e de opióides endógenos. Os efeitos sistêmicos da adenosina parecem principalmente mediados pela ativação de receptores A_1 , contudo, efeitos em receptores A_{2A} ou efeitos periféricos não podem ser descartados.

Capítulo 4

O consumo crônico de cafeína e as alterações na neuroplasticidade e no perfil comportamental de camundongos submetidos ao estresse crônico imprevisível

1. Introdução

A cafeína é a substância psicoativa mais consumida no mundo, sendo o principal estimulante presente no café (Fredholm et al., 1999). Ela está incluída no grupo de compostos conhecidos como metilxantinas sendo encontrada em mais de 63 espécies de plantas, incluindo nas folhas de chá e nas sementes de cacau. A cafeína é adicionada, artificialmente, a muitos outros produtos, como refrigerantes, bebidas energéticas e em algumas formulações farmacêuticas (Daly, 2007). Por ser um composto altamente solúvel, tanto em água quanto em solventes orgânicos apolares, ela é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal e distribuída pelos diferentes tecidos, passando facilmente pela barreira hematoencefálica e atingindo o sistema nervoso (Tanaka et al., 1984). Sua administração por via oral resulta em 100% de absorção, com o aparecimento na circulação cerca de 5 minutos após a ingestão. Sua eliminação é dependente de uma metabolização hepática e os metabólitos são eliminados pelos rins (Banati et al., 1982).

Os efeitos biológicos da cafeína estão relacionados a uma grande variedade de alvos moleculares. Nas concentrações atingidas pelo consumo médio da população ela age primariamente através do bloqueio dos receptores adenosinérgicos (Fredholm et al., 1999). No entanto, em concentrações elevadas também é capaz de inibir as enzimas fosfodiesterases; induzir a liberação de cálcio a partir do retículo endoplasmático; agir como antagonista de receptores GABA_A, entre outros (para revisão ver Fredholm et al., 1999). A cafeína é um antagonista não-seletivo de receptores adenosinérgicos, capaz de inibir tanto receptores A₁ quanto A_{2A}. No entanto, estudos *in vitro* demonstraram que sua afinidade pelos receptores A_{2A} é ligeiramente maior quando comparado aos receptores A₁ (A_{2A}: K_i=20.3±1.1 μM; A₁:=30.0± 2.9 μM) (Fredholm et al., 1999).

A cafeína é utilizada principalmente por suas ações estimulantes, no entanto estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que sua administração também apresenta efeitos benéficos em situações de prejuízo cognitivo e déficits de aprendizado e memória (Takahashi et al., 2008). Além disso, foi demonstrado um papel neuroprotector na doença de Parkinson (Schwarzschild et al., 2002) e na doença de Alzheimer (Maia e Mendonça, 2002). Animais submetidos ao estresse de imobilização subcrônico apresentam uma redução na densidade de receptores A_1 e um aumento na densidade de receptores A_{2A} no hipocampo (Cunha et al., 2006). Adicionalmente, o tratamento com um antagonista de receptores A_{2A} foi efetivo em prevenir a redução da densidade sináptica induzida pelo estresse (Cunha et al., 2006).

Tendo em vista a importância do sistema adenosinérgico na modulação de várias condições patológicas, como o estresse e depressão, além da ampla utilização da cafeína, substância psicoestimulante capaz de melhorar a função cognitiva, o objetivo deste capítulo é investigar o efeito do consumo crônico de cafeína sobre as alterações comportamentais e na neuroplasticidade induzidas por um modelo de estresse.

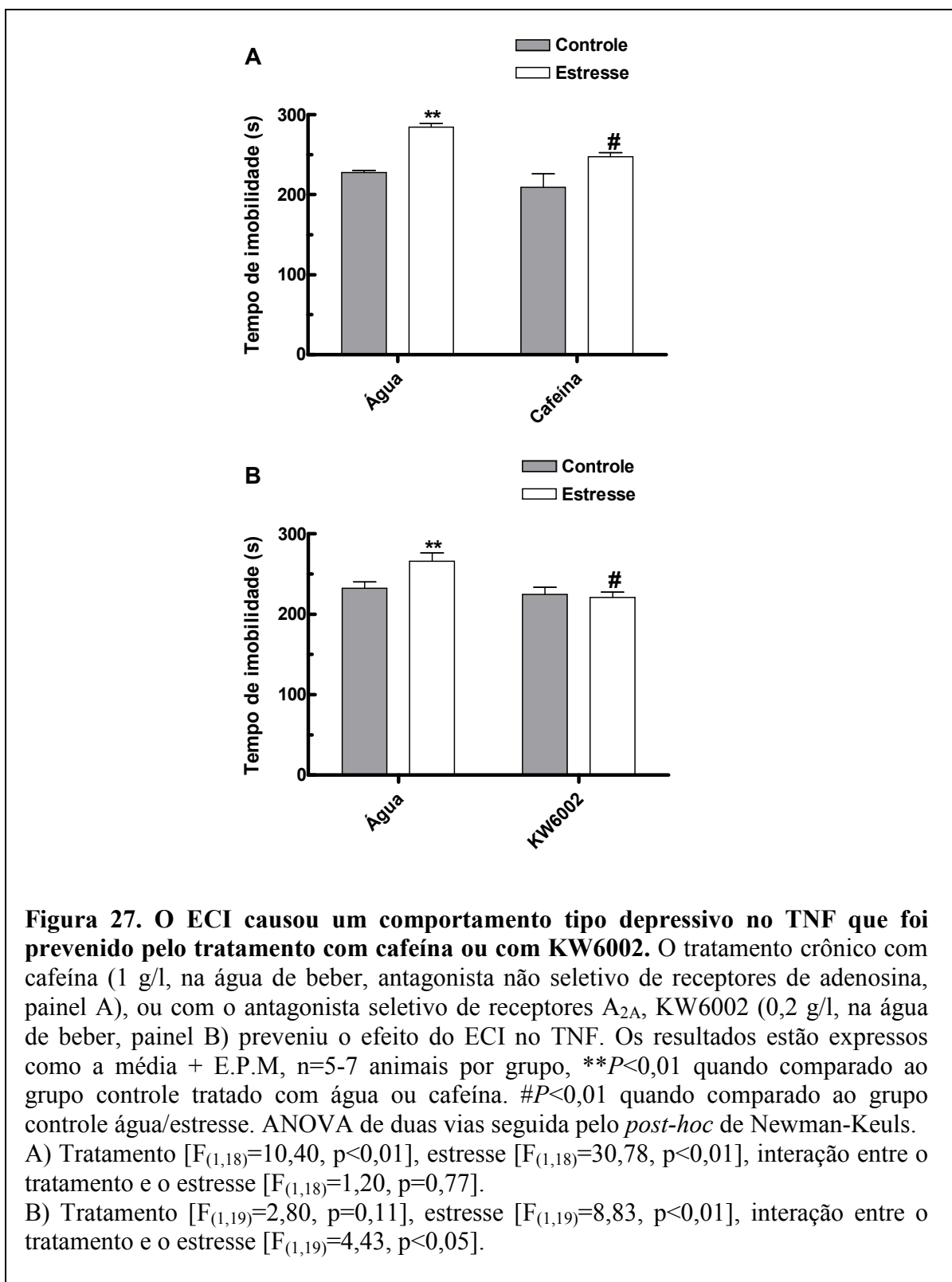
2. Resultados

2.1 Efeito do tratamento crônico com cafeína ou KW6002 sobre as alterações comportamentais induzidas pelo ECI

2.1.1. O ECI induziu um comportamento tipo depressivo no TNF que foi prevenido pelo tratamento crônico com cafeína ou pelo antagonista de receptores A_{2A} , KW6002.

Os animais submetidos ao ECI apresentaram um comportamento tipo depressivo no TNF. O tratamento crônico com cafeína (1 g/l, na água de beber, antagonista não seletivo de receptores de adenosina) protegeu parcialmente dos efeitos causados pelo

estresse (**Figura 27A**). O tratamento com o antagonista seletivo de receptores A_{2A} , KW6002 (0,2 g/l, na água de beber) preveniu completamente os efeitos do ECI no aumento do tempo de imobilidade dos animais no TNF (Figura 27B).



2.1.2. Aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona inzudido pelo ECI

Conforme apresentado na **Figura 28** a exposição dos animais ao ECI causou um aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona, evidenciando um efeito depressogênico do estresse. O tratamento crônico com cafeína também preveniu o efeito do ECI em aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona.

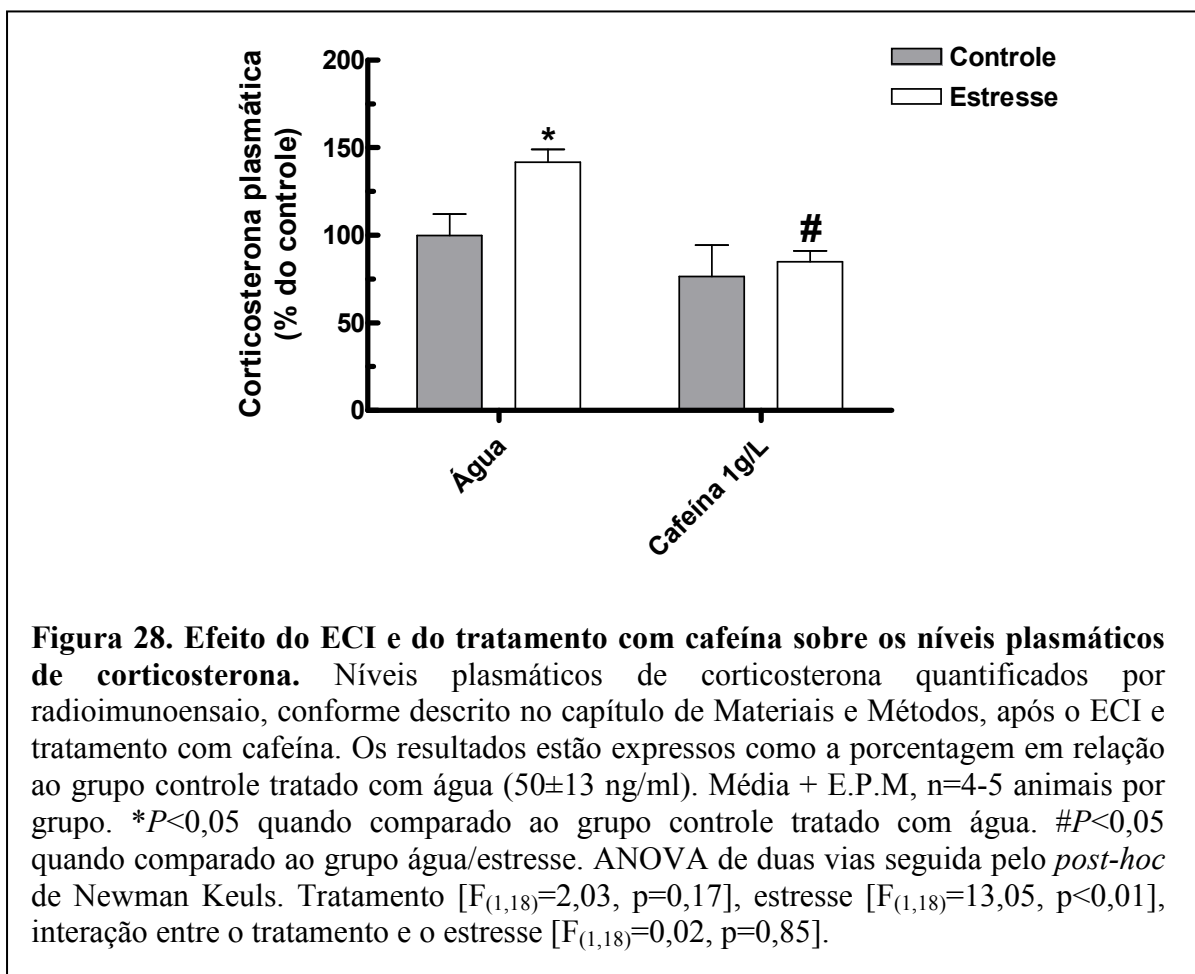
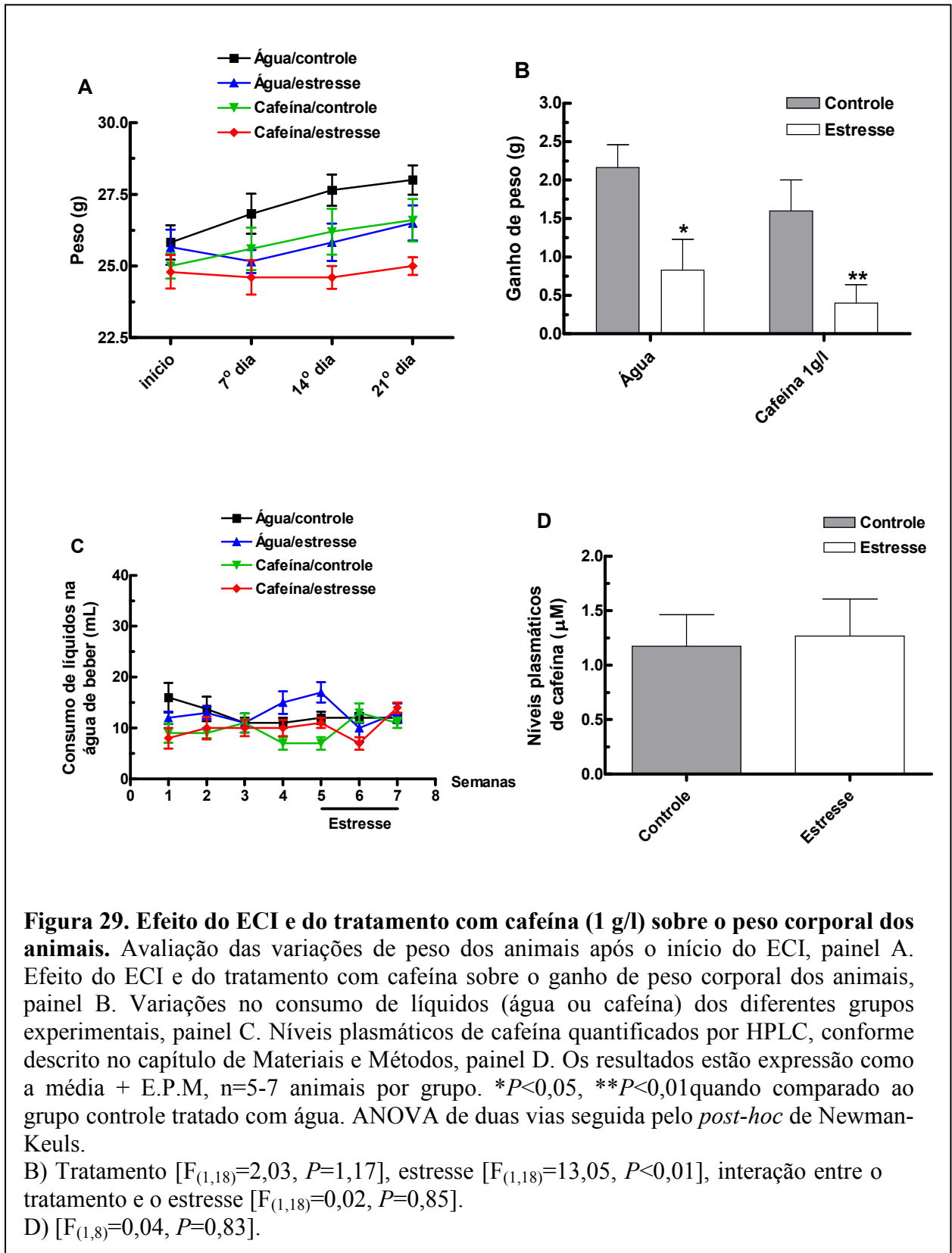


Figura 28. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína sobre os níveis plasmáticos de corticosterona. Níveis plasmáticos de corticosterona quantificados por radioimunoensaio, conforme descrito no capítulo de Materiais e Métodos, após o ECI e tratamento com cafeína. Os resultados estão expressos como a porcentagem em relação ao grupo controle tratado com água (50±13 ng/ml). Média + E.P.M, n=4-5 animais por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado com água. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo água/estresse. ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman Keuls. Tratamento [$F_{(1,18)}=2,03$, $p=0,17$], estresse [$F_{(1,18)}=13,05$, $p < 0,01$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,18)}=0,02$, $p=0,85$].

2.1.3. Redução no ganho de peso dos animais submetidos ao ECI

Os animais submetidos ao ECI tiveram um ganho de peso menor que os animais controle. O tratamento crônico com cafeína (1 g/l) não preveniu o efeito do estresse sobre o ganho de peso corporal dos animais (**Figuras 29A-B**). A ingestão média de líquidos (água ou cafeína) foi igual entre os grupos experimentais (**Figura 29C**). Os

níveis plasmáticos de cafeína não foram diferentes entre os grupos controle e estresse (Figura 29D). Os animais tratados com água não apresentaram cafeína plasmática.



2.1.4. O ECI induziu um aumento nos níveis de ansiedade que não foi prevenido pelo tratamento crônico com cafeína

O tratamento dos animais com cafeína (1 g/l) não foi efetivo em prevenir o efeito ansiogênico causado pelo ECI no labirinto em cruz elevado. Tanto o grupo de animais submetido ao estresse e tratado com água, quanto os grupos controle e estresse tratados com cafeína apresentaram uma redução no tempo de permanência nos braços abertos do aparato (**Figura 30A**). O número de entradas nos braços abertos do labirinto também foi menor em todos os grupos experimentais quando comparado ao controle (**Figura 30B**). No entanto, não foi observado efeito da interação entre o tratamento com cafeína e o estresse.

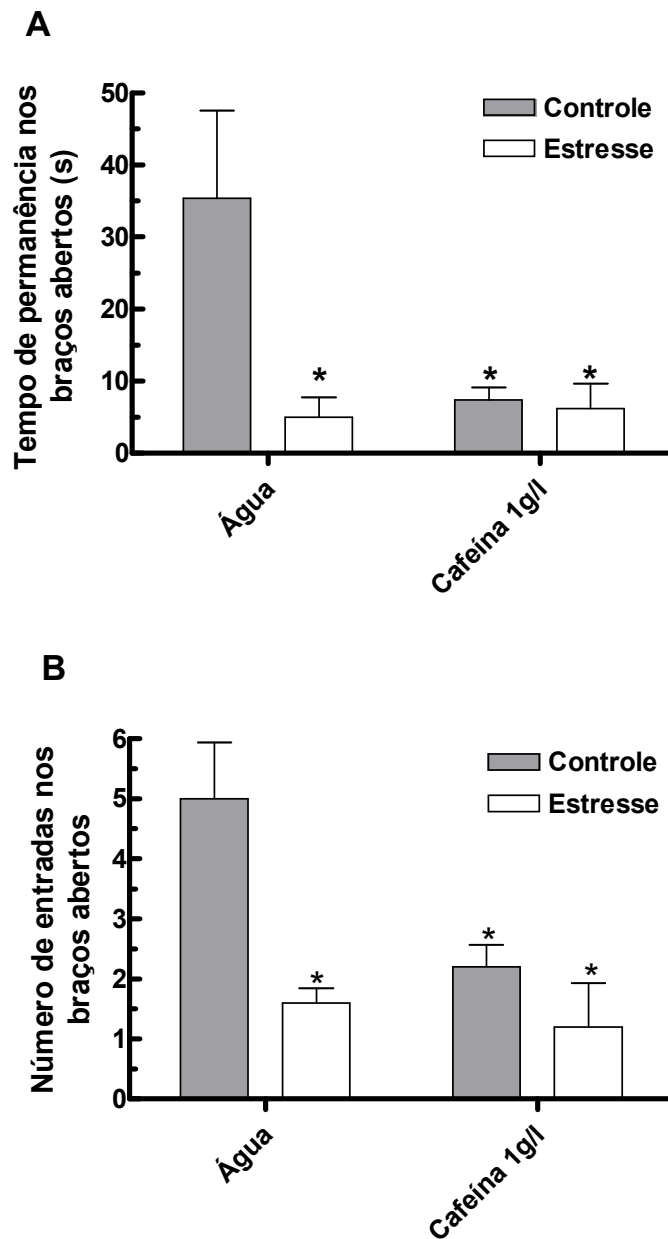


Figura 30. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína (1 g/l) no labirinto em cruz elevado. Avaliação do tempo de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, painel A e do número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, painel B. Os resultados estão expressos como a média + E.P.M, n=5 animais por grupo, * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado com água. ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

A) Tratamento [$F_{(1,16)}=4,20, P < 0,05$], estresse [$F_{(1,16)}=5,84, P < 0,05$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,16)}=4,98, P < 0,05$].

B) Tratamento [$F_{(1,16)}=6,24, P < 0,05$], estresse [$F_{(1,16)}=11,80, P < 0,01$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,16)}=3,51, P = 0,07$].

2.1.5 O tratamento crônico com KW6002 preveniu o efeito ansiogênico do ECI

O tratamento dos animais com KW6002 (0,2 g/l, na água de beber) não produziu qualquer efeito no labirinto em cruz elevado e foi efetivo em prevenir o efeito ansiogênico causado pelo ECI, tanto no tempo de permanência nos braços abertos do aparato (**Figura 31A**), quanto no número de entradas nos braços abertos do labirinto (**Figura 31B**).

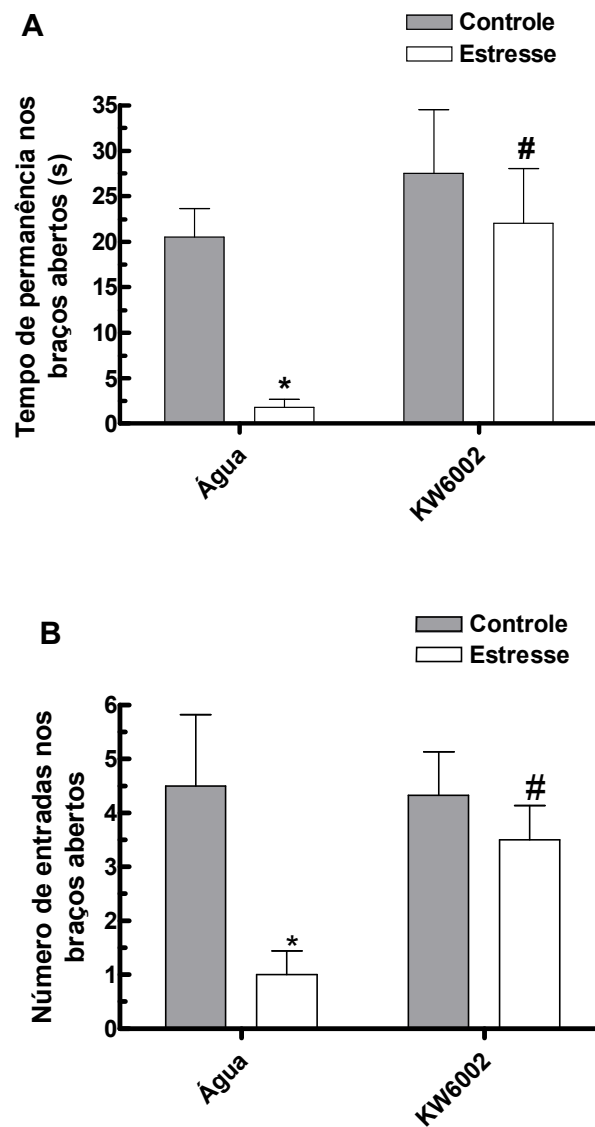


Figura 31. Efeito do ECI e do tratamento com KW6002 (0,2 mg/l) sobre os níveis de ansiedade dos animais no labirinto em cruz elevado. Avaliação do tempo de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, painel A e número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, painel B. Os resultados estão expressos como a média + E.P.M, n=5 animais por grupo, * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado com água. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo estresse/água. ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. A) Tratamento [$F_{(1,15)}=6,22, P < 0,05$], estresse [$F_{(1,15)}=4,92, P < 0,05$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,15)}=1,46 P=0,24$]. B) Tratamento [$F_{(1,15)}=1,91, P=0,18$], estresse [$F_{(1,15)}=6,58, P < 0,05$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,15)}=2,49, P=0,13$].

2.1.6. O prejuízo mnemônico induzido pelo ECI foi prevenido pelo tratamento crônico com cafeína

O tratamento dos animais com cafeína (1 g/l) preveniu o efeito do ECI nas alterações mnemônicas, avaliadas pela redução no número de alternâncias espontâneas no teste do Labirinto em Y (**Figura 32A**). Na versão modificada do teste do Labirinto em Y foi avaliado o tempo de exploração do braço novo. A administração crônica de cafeína também mostrou-se eficaz em prevenir a redução no tempo de exploração do braço novo causada pelo estresse (**Figura 32B**).

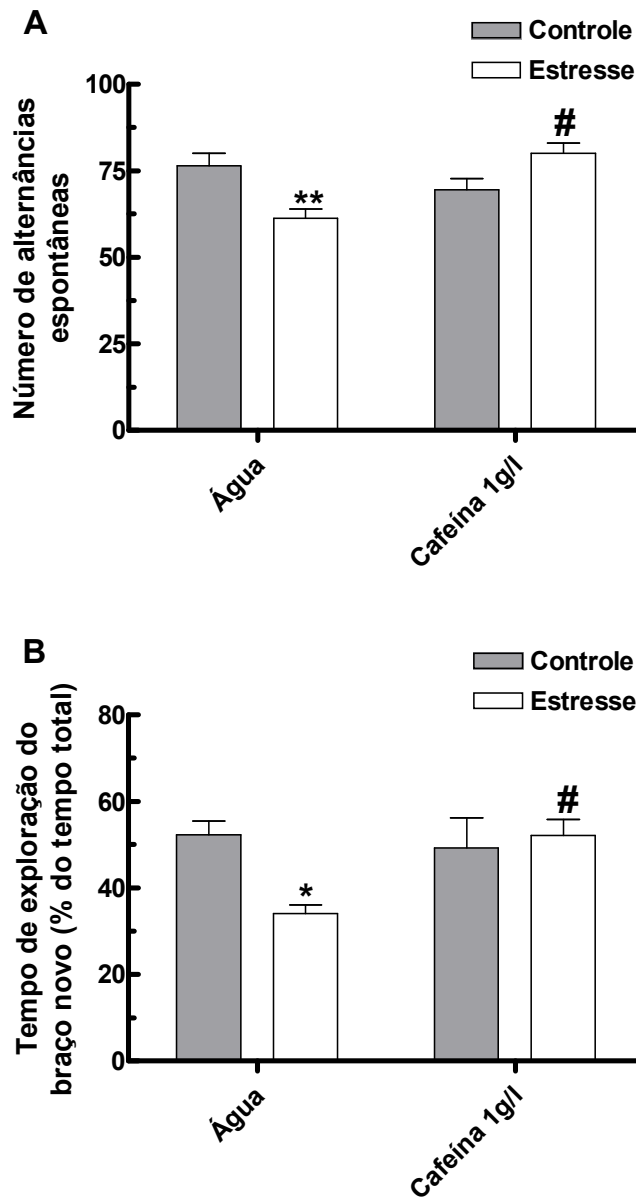


Figura 32. Efeito do ECI e do tratamento com cafeína (1 g/l) no teste do Labirinto em Y. Avaliação do número de alternâncias espontâneas no labirinto em Y, painel A e tempo de exploração do braço novo, painel B. Os resultados estão expressos como a média + E.P.M, n=5 animais por grupo, ** $P < 0,01$, * $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle tratado com água. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo água/estresse. ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

A) Tratamento [$F_{(1,16)}=3,62$, $P=0,07$], estresse [$F_{(1,16)}=0,56$, $P=0,46$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,16)}=16,77$, $P < 0,01$].

B) Tratamento [$F_{(1,16)}=2,85$, $P=0,11$], estresse [$F_{(1,16)}=3,01$, $P < 0,10$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,16)}=5,75$, $P < 0,05$].

2.1.8 O prejuízo mnemônico induzido pelo ECI foi prevenido pelo tratamento crônico com KW6002

O tratamento dos animais com KW6002 (0,2 g/l) preveniu o efeito do ECI nas alterações mnemônicas, avaliadas pela redução no número de alternâncias espontâneas no teste do Labirinto em Y (**Figura 33A**) e pelo tempo de exploração do braço novo, no Labirinto em Y modificado (**Figura 33B**).

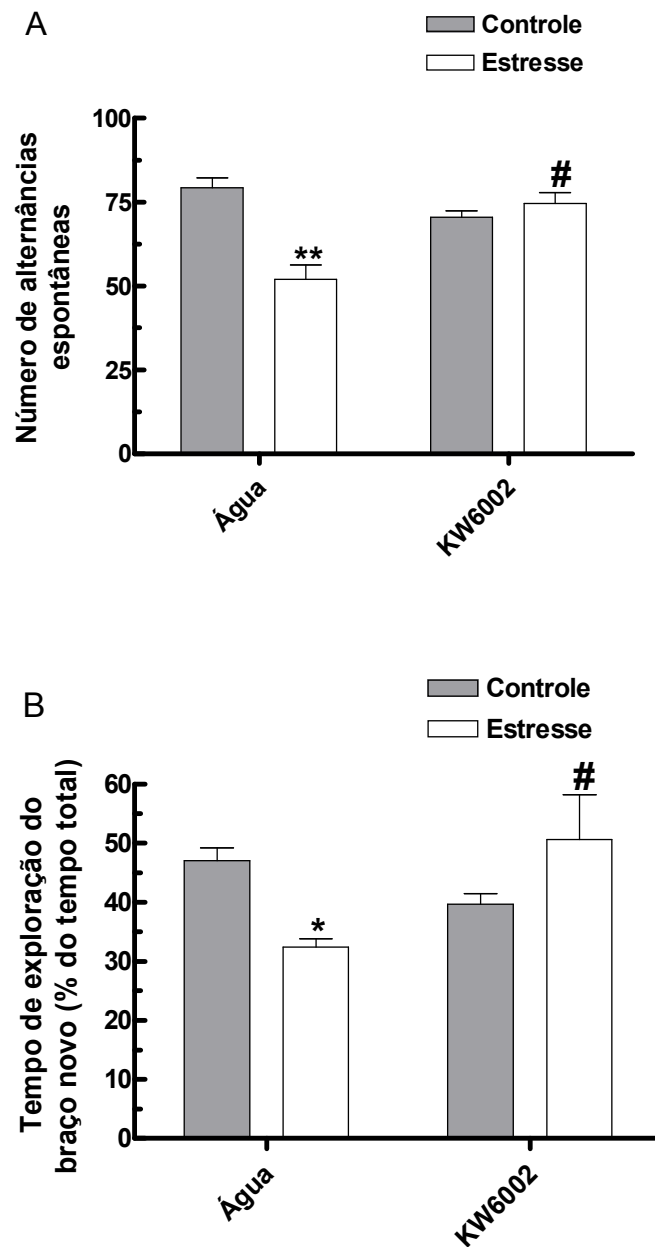


Figura 33. Efeito do ECI e do tratamento com KW6002 (0,2 g/l) no teste do Labirinto em Y. Avaliação do número de alternâncias espontâneas no Labirinto em Y, painel A e tempo de exploração do braço novo, painel B. Os resultados estão expressos como a média + E.P.M, n=5 animais por grupo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo controle tratado com água. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo água/estresse. ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

A) Tratamento [$F_{(1,14)}=5,72$, $P < 0,05$], estresse [$F_{(1,14)}=16,61$, $P < 0,01$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,14)}=30,05$, $P < 0,01$].

B) Tratamento [$F_{(1,17)}=1,87$, $P=0,18$], estresse [$F_{(1,17)}=0,20$, $P=0,65$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,17)}=10,49$, $P < 0,01$].

2.1.9. O ECI e o tratamento crônico com cafeína ou KW6002 não alteraram a atividade locomotora no campo aberto

A atividade locomotora dos animais, avaliada pelo teste do campo aberto, não foi alterada em função do tratamento com cafeína (Figura 34A) ou KW6002 (**Figura 34C**) ou da exposição ao ECI. A exploração vertical, ou número de “rearings”, também avaliada no teste do campo aberto mostrou-se reduzida nos animais submetidos ao ECI quando comparado ao grupo controle. No entanto, não houve uma interação significativa entre o estresse e o tratamento com cafeína (**Figura 34B**) ou KW6002 (**Figura 34D**).

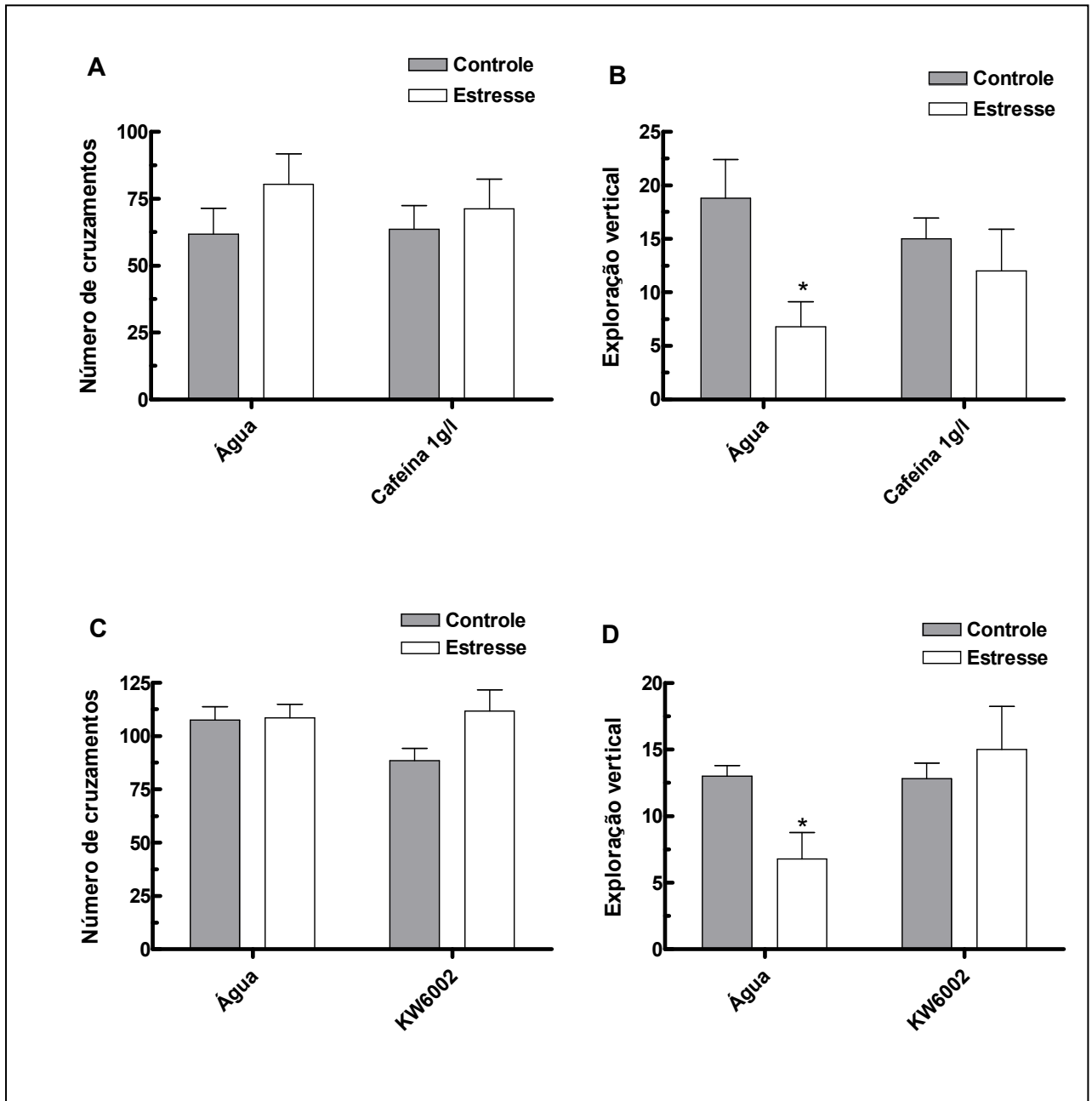


Figura 34 – Efeito do ECI e do tratamento com cafeína (1 g/l) ou KW6002 (0,2 g/l) sobre a atividade exploratória horizontal e vertical no teste do campo aberto. Avaliação da exploração horizontal através do número de cruzamentos no teste do campo aberto, painéis A e C. Número de “rearing” ou exploração vertical no teste do campo aberto, B e D. Os resultados estão expressos como a média + E.P.M, n=5 animais por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle tratado com água. ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

A) Tratamento [$F_{(1,16)}=0,12, P=0,72$], estresse [$F_{(1,16)}=1,62, P=0,22$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,16)}=0,28, P=0,60$].

B) Tratamento [$F_{(1,16)}=0,05, P=0,82$], estresse [$F_{(1,16)}=5,95, P < 0,05$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,16)}=2,14, p=0,16$].

C) Tratamento [$F_{(1,14)}=1,29, P=0,27$], estresse [$F_{(1,14)}=2,29, P=0,11$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,14)}=2,50, P=0,13$].

D) Tratamento [$F_{(1,15)}=4,40, P=0,05$], estresse [$F_{(1,15)}=1,11, P=0,30$], interação entre o tratamento e o estresse [$F_{(1,15)}=4,77, P < 0,05$].

2.2. Efeitos do ECI e do tratamento com cafeína sobre parâmetros de neurodegeneração e sinaptotoxicidade

2.2.1. A exposição dos animais ao ECI não causou morte neuronal

Os animais submetidos ao ECI não apresentaram neurodegeneração hipocampal. Nenhuma das sub-regiões avaliadas apresentou marcação para o corante fluorescente Fluoro Jade C (**Figura 35**), utilizado para avaliar a presença de morte neuronal.

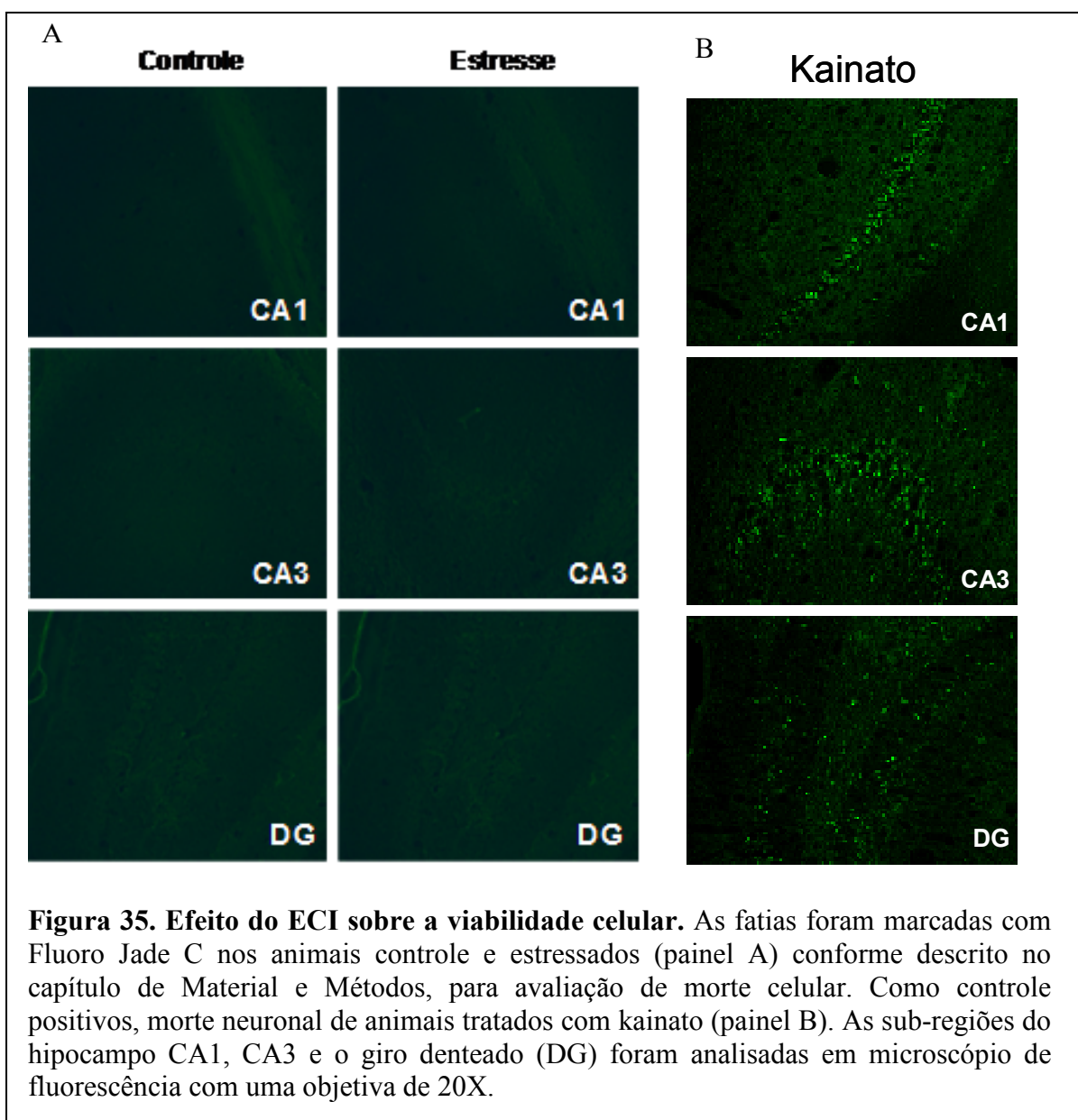
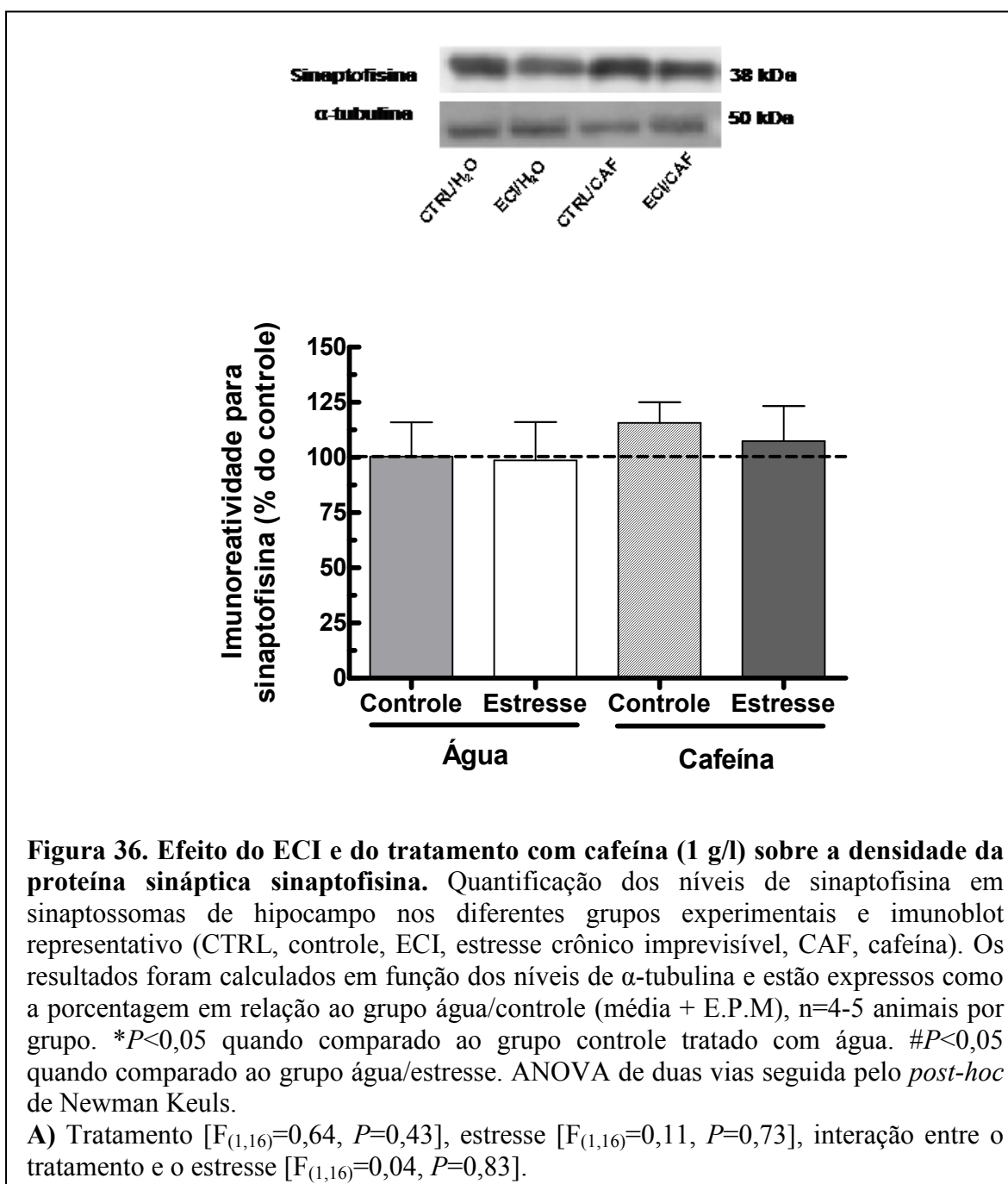


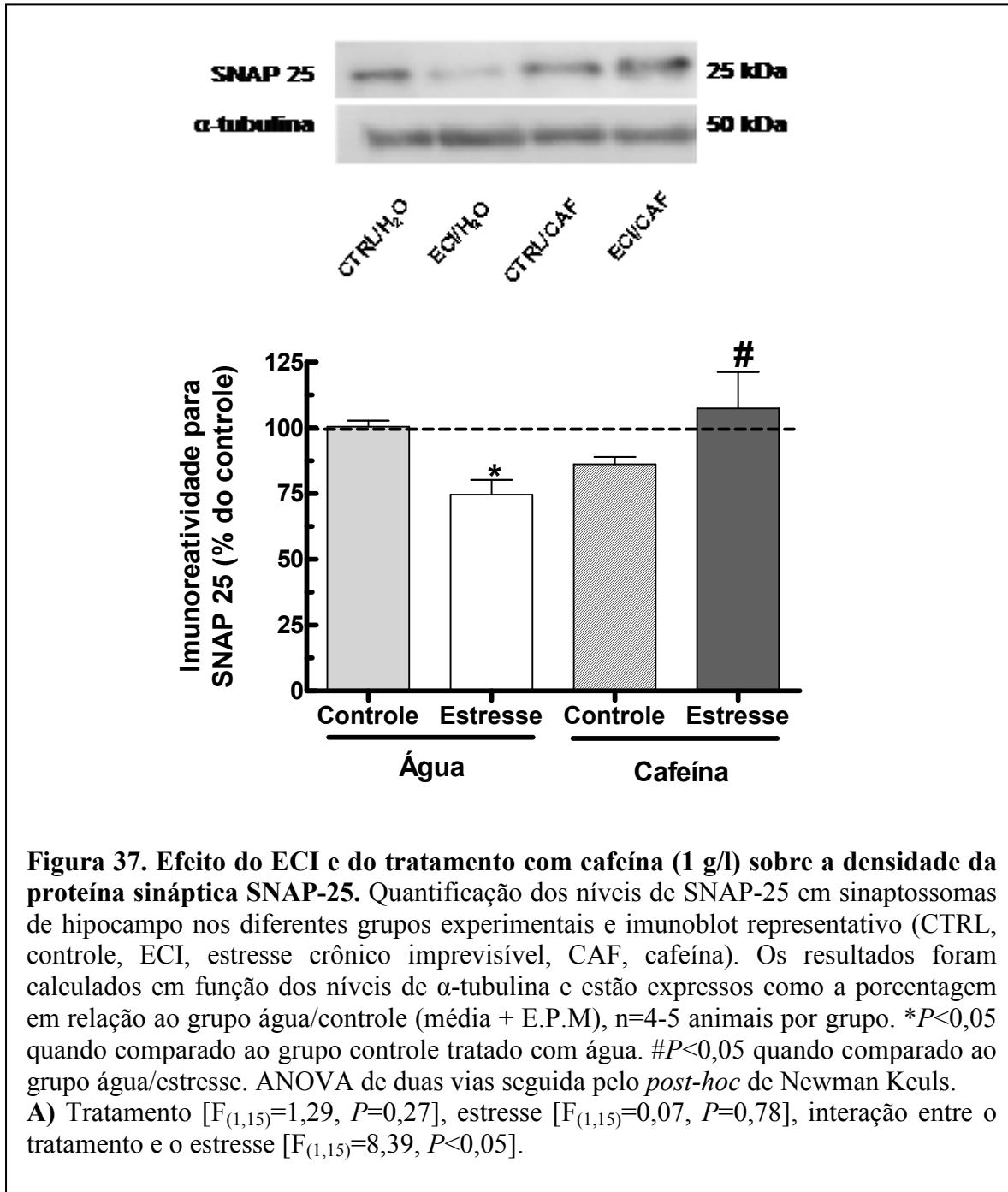
Figura 35. Efeito do ECI sobre a viabilidade celular. As fatias foram marcadas com Fluoro Jade C nos animais controle e estressados (painel A) conforme descrito no capítulo de Material e Métodos, para avaliação de morte celular. Como controle positivos, morte neuronal de animais tratados com kainato (painel B). As sub-regiões do hipocampo CA1, CA3 e o giro denteado (DG) foram analisadas em microscópio de fluorescência com uma objetiva de 20X.

2.2.2. Efeito do ECI e do tratamento crônico com cafeína sobre o conteúdo de proteínas sinápticas em sinaptossomas de hipocampo

Os animais submetidos ao ECI e tratados com cafeína não apresentaram alterações na densidade da proteína sináptica sinaptofisina (**Figura 36**). No entanto, o ECI reduziu a densidade da SNAP-25, efeito que foi completamente prevenido pelo tratamento com cafeína (**Figura 37**).

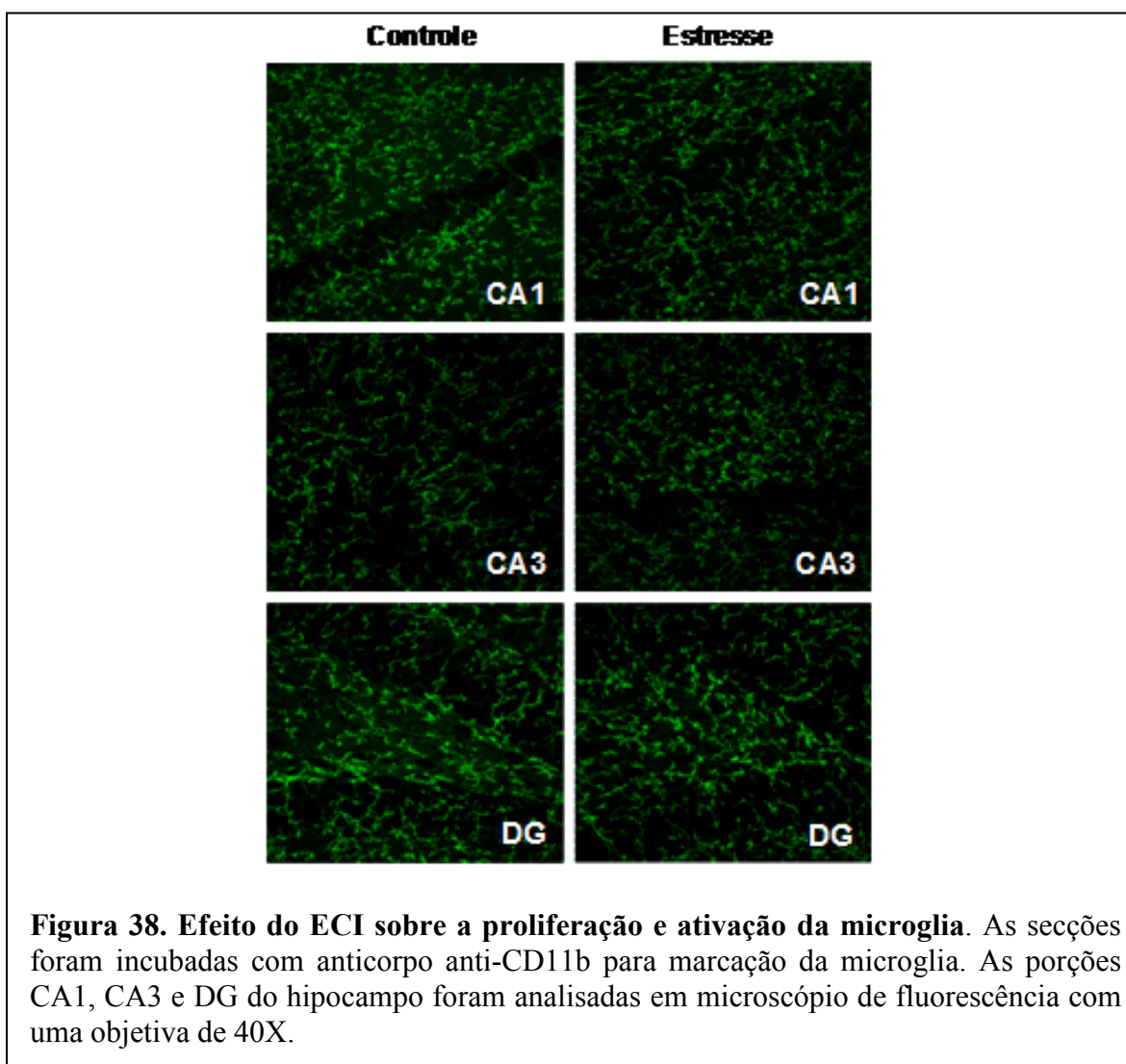


O ECI reduziu a densidade da SNAP-25, efeito que foi completamente prevenido pelo tratamento com cafeína (Figura 37).



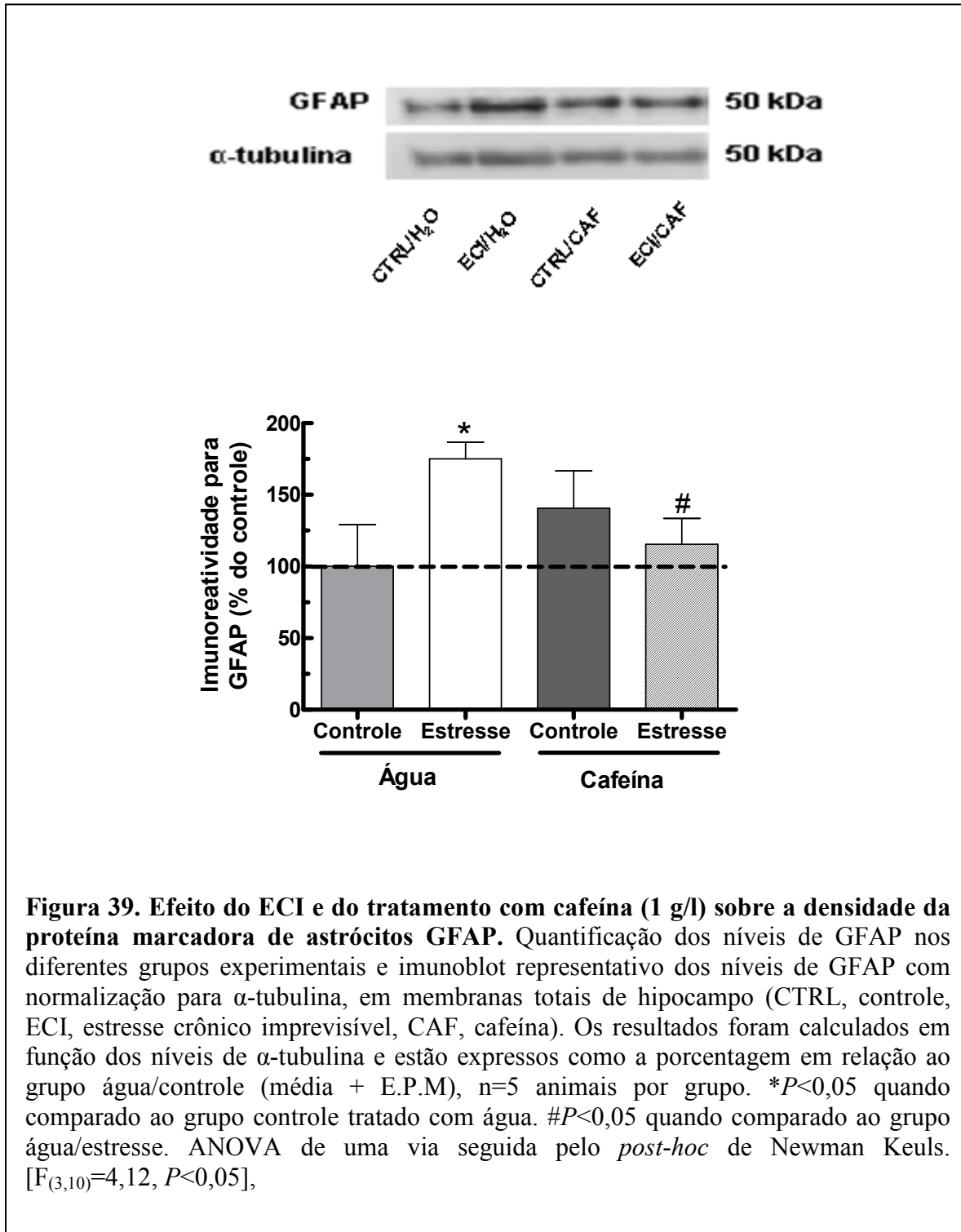
2.2.3. Efeito do ECI sobre a reatividade microglial caracterizada pela marcação com CD11b

A proteína CD11b é uma glicoproteína de membrana expressa em células imunocompetentes. No sistema nervoso, ela representa um marcador de células microgliais. Nos animais submetidos ao ECI, não foi observado um aumento na reatividade das células da microglia, uma vez que não houve ativação da microglia (caracterizada pela mudança na morfologia celular de um estado ramificado para um estado amebóide). Além disso, nas sub-regiões do hipocampo avaliadas não houve diferenças na imunorreatividade para CD11b, indicando a ausência de proliferação ou quimiotaxia das células microgliais (**Figura 38**).

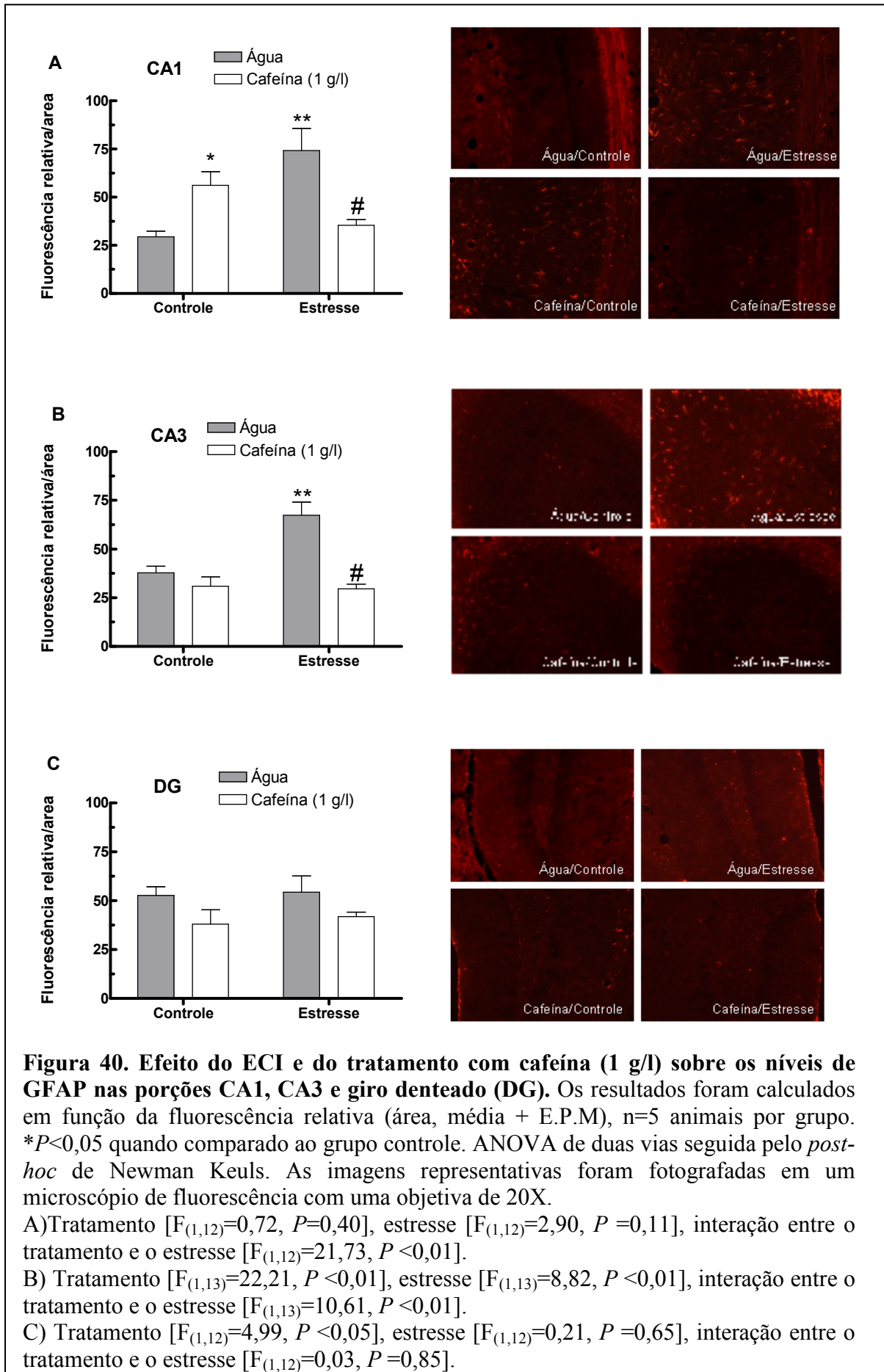


2.2.4. Efeito do ECI e do tratamento crônico com cafeína sobre a reatividade astrocitária

O ECI causa um aumento na densidade da proteína glial GFAP, efeito que foi prevenido pelo tratamento com cafeína (1g/l) (**Figura 39**).



Conforme apresentado na **Figura 40**, foi feita uma imunohistoquímica para avaliação de alterações regionais na proliferação dos astrócitos hipocâmpais em função do ECI e do tratamento com cafeína. Um aumento na imunorreatividade para a proteína de filamentos intermediários GFAP, um clássico marcador de astrócitos diferenciados, foi observado nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo (painéis A-B). O tratamento com cafeína *per se* também foi capaz de aumentar a imunorreatividade para GFAP na porção CA1 (painel A), no entanto quando aplicado nos animais expostos ao ECI foi capaz de prevenir o efeito do estresse (painel A). Na região CA3 do hipocampo, a cafeína não apresentou efeito *per se* na imunorreatividade para a proteína GFAP mas foi capaz de prevenir o efeito do ECI (painel B). Nenhum efeito do ECI ou do tratamento crônico com cafeína foi observado no giro denteado com relação à densidade de GFAP (painel C).



3. Discussão

3.1. Efeitos comportamentais do ECI e do tratamento crônico com cafeína ou KW6002.

3.1.1 Depressão

Nossos resultados demonstram que o ECI produz um comportamento tipo depressivo, avaliado pelo aumento do tempo de imobilidade no TNF. O TNF é um dos modelos comportamentais mais utilizados para o estudo da depressão, e baseia-se na observação de que quando os animais são submetidos a uma situação onde não há possibilidade de escape, após um período de agitação inicial eles adotam uma postura de imobilidade. A redução no tempo de imobilidade é o efeito observado após a administração de várias classes de fármacos antidepressivos (Porsolt et al., 1977), já o aumento deste tempo caracteriza um estado “depressivo” dos animais ou um efeito depressogênico de fármacos (Galeoti et al., 1999; Makino et al., 2000). Assim, o ECI aplicado foi efetivo em induzir um estado tipo depressivo nos animais, o que corrobora com dados da literatura que relatam que vários modelos de estresse crônico são capazes de induzir um comportamento depressivo em roedores (D’Aquila et al., 1994; Moreau et al., 1995; Kubera et al., 2001; Joels et al., 2004). O estresse tem uma íntima relação com o desenvolvimento e a manutenção do transtorno depressivo. Estudos epidemiológicos relacionam eventos estressantes durante a vida como o principal fator ambiental na etiologia e progressão desta doença (Vollmayr e Hen, 2003). A depressão é presumivelmente o resultado da interação entre os efeitos do estresse ambiental e a predisposição genética (Kloet et al., 2005).

O tratamento crônico com cafeína, antagonista de receptores A₁ e A_{2A} não produziu efeito antidepressivo *per se*, mas foi capaz de prevenir o comportamento

depressivo causado pelo estresse, reduzindo o tempo de imobilidade dos animais no TNF. Além disso, o tratamento por seis semanas com o antagonista seletivo de receptores A_{2A} , KW6002, também não reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TNF, mas foi efetivo em prevenir o efeito depressogênico do estresse crônico. O KW6002 foi o primeiro antagonista seletivo de receptores A_{2A} , ativo quando administrado por via oral. A seletividade deste antagonista é 68 vezes maior para os receptores A_{2A} quando comparado aos receptores A_1 (Shimada et al., 1997) e tem se mostrado efetivo em estudos pré-clínicos e clínicos da doença de Parkinson (Kase et al., 2003; Pierri et al., 2005). Este é o primeiro estudo relacionando o efeito crônico do bloqueio dos receptores adenosinérgicos e efeito antidepressivo. Várias evidências têm reforçado a existência de um papel relevante do sistema adenosinérgico na etiopatologia da depressão. A adenosina tem a capacidade de modular vários sistemas com papel chave na depressão, atuando na liberação de 5-HT (Okada et al., 2001), liberação de corticotrofina e cortisol/corticosterona (Geiger e Glavin, 1989; Chau et al., 1999; Chen et al., 2008). Alguns estudos têm sugerido que o aumento nos níveis de adenosina pode estar relacionado a um efeito antidepressivo. Antidepressivos tricíclicos como a nortriptilina, clomipramina e desipramina, são ligantes de receptores de adenosina (Deckert e Gleiter, 1989) e capazes de aumentar a liberação de adenosina em neurônios corticais (Phillis et al., 1982; 1984). Além disso, tanto a privação de sono quanto a terapia eletroconvulsiva, duas medidas terapêuticas efetivas no tratamento dos distúrbios do humor, estão associadas com um aumento na liberação de adenosina e na expressão de receptores A_1 (Van Calker e Biber, 2005). Nosso grupo demonstrou que a ativação de receptores A_1 e A_{2A} produz um efeito antidepressivo no TNF e TSC em camundongos (Kaster et al., 2004). Por outro lado, estudos em modelos animais também descrevem que tanto animais com depleção genética dos receptores A_{2A} quanto

a administração de antagonistas destes receptores produz um efeito antidepressivo no TNF (El Yacoubi et al., 2001).

Apesar de parecer contraditório, os efeitos agudos e crônicos dos ligantes de receptores adenosinérgicos, incluindo a cafeína, são geralmente opostos. Isto é, o tratamento por longos períodos com antagonistas de receptores A₁ e A_{2A} tem o mesmo efeito do tratamento agudo com seus agonistas. Isso tem sido particularmente evidenciado em situações de isquemia, convulsão e processos cognitivos (Jacobson et al., 1996). Foi demonstrado recentemente que animais submetidos ao estresse de imobilização sub-crônico apresentam uma redução na densidade de receptores A₁ e um aumento na densidade de receptores A_{2A} no hipocampo (Cunha et al., 2006). Adicionalmente, o tratamento por sete dias com um antagonista de receptores A_{2A} foi efetivo em prevenir a redução da densidade sináptica induzida pelo estresse de imobilização (Cunha et al., 2006). O tratamento crônico com cafeína, por sua vez, causa um aumento na densidade dos receptores A₁ e não altera a ligação específica ou a expressão do RNAm para os receptores A_{2A} no núcleo estriado (Fredholm et al., 1999), podendo ser particularmente relevante em situação de estresse. Além disso, um aumento nos níveis de receptores serotoninérgicos, receptores δ-opiídeos e receptores GABA, receptores intimamente relacionados com a patofisiologia e tratamento da depressão, também foi relatado após o consumo crônico de cafeína (Fredholm et al., 1999).

3.1.2. Peso e níveis plasmáticos de corticosterona

Nossos resultados demonstram que o ECI produz um aumento sustentado nos níveis plasmáticos de corticosterona, sugerindo que este modelo é efetivo em induzir um perfil depressivo nos animais, visto que a depressão maior é frequentemente acompanhada por hipercortisolemia (Swaab et al., 2005). A ingestão crônica de cafeína

foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de corticosterona causado pelo ECI. A cafeína modula os níveis de glicocorticóides e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), no entanto seus efeitos permanecem bastante controversos. Alguns trabalhos sugerem que a administração aguda de cafeína aumenta os níveis de corticosterona e cortisol (Li et al., 1997; Nicholson, 1989). Além disso, altas doses podem induzir a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (ACTH) e corticosterona *in vitro* (Nicholson, 1989). No entanto, estudos também relatam que baixas doses de cafeína atenuam o efeito do estresse na ativação do eixo HPA (Svenningsson et al., 1995; Garret e Holtzman, 1995). Um trabalho recente demonstrou que a ativação de receptores A_{2A} e A_{2B} promove a produção de glicocorticóides pela células do córtex adrenal (Chen et al., 2008). Contudo, Pettenuzzo et al. (2008) demonstraram que o tratamento crônico com 0,3 ou 1g/l de cafeína não alterou os níveis plasmáticos de corticosterona quando comparado ao controle. Embora o mecanismo pelo qual a cafeína modula a liberação de glicocorticóides ainda precise ser melhor elucidado, nossos dados corroboram com estes efeitos descritos na literatura, uma vez que o tratamento crônico com baixas doses de cafeína não alterou os níveis plasmáticos de corticosterona *per se*, mas foi capaz de reduzir o aumento induzido pelo ECI.

Demonstramos ainda que os animais submetidos ao ECI apresentaram um menor ganho de peso quando comparado ao controle. De fato, o estresse crônico induz uma diminuição no peso corporal dos animais (Levin et al., 2000; Pecoraro et al., 2004), efeito que está principalmente relacionado com a ação dos glicocorticóides, mobilização das reservas energéticas e aumento da gliconeogênese hepática (Dallman et al., 2005; Torres e Nowson, 2007). No entanto, alguns trabalhos relatam que estimulantes do SNC causam uma redução no apetite, e que a administração aguda de cafeína parece exercer pequenos efeitos anorexígenos, reduzindo o consumo de calorias (Palmatier e Bevis,

2001). Neste estudo, o tratamento crônico com baixas doses de cafeína *per se* não causou uma diminuição no ganho de peso dos animais quando comparado ao controle. Da mesma maneira, Pettenuzzo et al. (2008) observaram que a administração de 0,3 ou 1 g/l de cafeína por 40 dias em ratos não altera a ingestão de ração ou o peso dos animais. No entanto, Pettenuzzo et al (2008) relataram que, apesar de não apresentar efeito *per se*, a cafeína foi capaz de reverter os efeitos do estresse de imobilização sobre o ganho de peso dos animais. No entanto, nossos resultados demonstram que o tratamento crônico com cafeína não previne os efeitos anorexígenos do ECI. Diferenças no tipo de estresse ou mesmo diferenças entre espécies podem estar relacionadas com este efeito.

3.1.3 Ansiedade

Dados clínicos demonstram que a comorbidade entre distúrbios de ansiedade e distúrbios depressivos é freqüente, levando muitos autores a sugerir que altos índices de ansiedade representam um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios do humor (Ballenger, 1999; Stain, 2001). Em modelos animais, a exposição crônica de roedores a diferentes agentes estressores tanto físicos quanto psicológicos e a manifestação de um comportamento tipo depressivo estão frequentemente associados a altos níveis de ansiedade (Griebel et al., 2002; Maslova et al., 2002). Nossos dados reforçam esta hipótese, demonstrando que o ECI produz um comportamento tipo ansiogênico nos animais, caracterizado por uma redução no tempo de permanência e no número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

O tratamento oral com cafeína (1g/l), administrada por sete semanas, produziu um efeito ansiogênico semelhante ao efeito do estresse. No entanto, o grupo de animais tratados com cafeína e submetidos ao protocolo de ECI não obteve potencialização dos níveis de ansiedade quando comparado aos grupos que receberam cafeína ou estresse

separadamente. Por outro lado, o tratamento crônico com o antagonista seletivo de receptores A_{2A}, KW6002, não produziu um aumento nos níveis de ansiedade nos animais e foi efetivo em prevenir o efeito ansiogênico do estresse.

Os efeitos ansiogênicos da cafeína após administração aguda têm sido bem documentados na literatura em diferentes modelos animais, como o teste de interação social (Baldwin et al., 1989; Bhattacharya et al., 1997), labirinto em cruz elevado (Pellow et al., 1985; Baldwin et al. 1989) e o teste da caixa clara/escuro (Imaizumi et al., 1994). No entanto, os efeitos de uma administração prolongada permanecem controversos, uma vez que a tolerância é um fenômeno bastante relatado após administração crônica de vários antagonistas adenosinérgicos, incluindo a cafeína (Jacobson et al., 1996). Alguns trabalhos comportamentais mostram que quando administrada cronicamente a cafeína perde seus efeitos estimulantes e ansiogênicos (Bhattacharya et al., 1997). Por outro lado, El Yacoubi et al. (2000) demonstraram que a administração repetida (8 dias) de 0,3 g/l de cafeína é capaz de causar um efeito tipo ansiogênico em camundongos no labirinto em cruz elevado, este efeito é ainda mais evidente quando a ingestão de cafeína é prolongada por 60 dias.

O mecanismo responsável pelos efeitos ansiogênicos da cafeína não está bem estabelecido. Embora o potencial ansiolítico de agonista A₁ e A_{2A} (Jain et al., 1995; Florio et al., 1998) e o efeito ansiogênico da depleção genética destes receptores esteja relatado na literatura (Gimenez-Llort et al., 2002; Lang et al., 2003), alguns trabalhos apresentam resultados contraditórios (El Yacoubi et al., 2000). Além disso, antagonistas seletivos de receptores A₁ e A_{2A} não apresentaram efeitos ansiogênicos em roedores, sugerindo a existência de mecanismos adaptativos responsáveis pelos efeitos crônicos da cafeína ou ainda pela depleção genética dos receptores A₁ e A_{2A} (El Yacoubi et al., 2000).

Apesar da alta comorbidade entre distúrbios de ansiedade e transtornos depressivos e da freqüente utilização de antidepressivos no tratamento da ansiedade (Argyropoulos et al., 2000), nossos resultados indicam que o tratamento com cafeína é capaz de melhorar os sintomas depressivos apesar de aumentar os níveis de ansiedade. Apesar do efeito do estresse na função cognitiva e no humor estar ligado a alterações da plasticidade hipocampal, os aspectos afetivos relacionados com o estresse, como a ansiedade, estão relacionados principalmente com o *bed striatalis* (Pêgo et al., 2008) e a amígdala, que desempenha um papel fundamental no processamento de experiências aversivas (LeDoux et al., 2003). Além disso, ao contrário do hipocampo, a amígdala é capaz de estimular o eixo HPA (Herman et al., 1996) e transtornos de ansiedade aumentam o volume dessa região (Anand e Shekhar, 2003). Da mesma forma, trabalhos em roedores demonstraram que o estresse crônico de imobilização causa atrofia hipocampal e promove um aumento da arborização dendrítica na porção basolateral da amígdala e dos níveis de ansiedade (Vyas e Chattarji, 2004; Vyas et al., 2004). Assim, nossos resultados sugerem que os efeitos da cafeína podem ser diferentes no hipocampo e na amígdala e reforçam a hipótese levantada por Govindarajan e colaboradores (2006) que a eficácia de fármacos utilizados no tratamento da depressão e da ansiedade pode ser uma consequência de um efeito diferencial nestas duas estruturas. Contudo, a separação entre os efeitos terapêuticos e adversos permanece um desafio para a utilização de compostos que atuam em receptores adenosinérgicos como alternativas terapêuticas.

3.1.4. Memória

Nossos resultados demonstram ainda que o ECI produz um prejuízo cognitivo avaliado pela performance no Labirinto em Y e no Labirinto em Y modificado, efeitos

que foram completamente prevenidos pelo tratamento crônico com cafeína ou com KW6002. Uma grande variedade de modelos de estresse crônico, tanto físicos como psicológicos, causa prejuízo na memória espacial avaliada por diferentes testes como Labirinto em Y (Wright e Conrad, 2005; Wright et al., 2006) e labirinto radial (Luine et al., 1994). Estes efeitos estão ligados principalmente a hiperreatividade prolongada do eixo HPA e aos altos níveis de glicocorticóides gerados em resposta ao estresse crônico. Estes fatores estão relacionados com uma redução na plasticidade dos circuitos neurais e com modificações morfológicas no córtex límbico, sobretudo diminuição da arborização dendrítica e do número de contatos sinápticos (Maragiños e MsEwen, 1995; Maragiños et al., 1997).

Tem sido descrito em inúmeros estudos que a cafeína induz a potenciação de longa duração (Martin e Bruno, 2003), fenômeno de plasticidade sináptica que se acredita estar na base neurobiológica da memória e do aprendizado. Além disso, a cafeína, agindo principalmente por antagonizar as respostas via receptores A₁, aumenta a liberação de glutamato, um neurotransmissor excitatório intimamente envolvido no processamento cognitivo, em sinaptossomas de córtex cerebral de rato (Wang, 2007). A cafeína tem ainda a habilidade de alterar a morfologia dendrítica e induzir a formação de novas espinhas dendríticas em culturas de neurônios (Korkotian e Segal, 1999).

Foi demonstrado que doses moderadas de cafeína não causam efeito benéficos na memória em animais ou indivíduos jovens e saudáveis, porém são capazes de melhorar o desempenho cognitivo em animais e indivíduos idosos ou com déficits mnemônicos (revisto em Takahashi et al., 2008). Cunha et al., 2008), assim como em modelos animais de comprometimento mnemônico associado à doença de Parkinson (Da Cunha et al., 2001) e em ratos espontaneamente hipertensos, que mimetizam uma condição de déficit de atenção e hiperatividade (Prediger et al., 2005a,b). Outros estudos

sugerem ainda que o aumento na expressão de receptores A_{2A} está relacionado com prejuízo cognitivo (Gimenez-Llort et al., 2007), enquanto sua deleção genética é capaz de melhorar a performance mnemônica (Wang et al., 2006).

3.1.5. Atividade locomotora

Por fim, nossos resultados demonstram que nem o ECI, nem o tratamento crônico com cafeína ou KW6002, produzem alterações na locomoção horizontal, avaliada no teste do campo aberto. O estresse crônico reduziu o número de *rearings*, mas não houve efeito da cafeína ou mesmo da interação entre o estresse e o tratamento com cafeína na exploração vertical no campo aberto. Existem evidências de que o tratamento crônico com cafeína (Ferré, 2008), assim como a depleção genética dos receptores A_{2A} tem efeitos depressores na atividade locomotora (El Yacoubi et al., 1997). Além disso, El Yacoubi et al. (2000), observaram uma pequena redução na locomoção dos animais tratados por 60 dias com cafeína, avaliada pela redução na distância total percorrida no labirinto em cruz elevado.

Desta forma, o conjunto destas observações comportamentais indica que a administração crônica de cafeína é capaz de prevenir o efeito depressivo e o prejuízo cognitivo causado pelo estresse. No entanto, sua administração prolongada pode causar um aumento nos níveis de ansiedade. Nossos resultados suportam ainda a idéia de que estes efeitos comportamentais da administração crônica de cafeína são específicos e não causados por alterações na atividade locomotora dos animais. Além disso, é importante ressaltar que os animais não apresentaram diferenças na ingestão de líquidos (água ou cafeína) e que os níveis plasmáticos de cafeína foram semelhantes nos animais controle e submetidos ao estresse, sendo indetectáveis nos grupos tratados com água.

3.2. Efeitos do ECI e da ingestão de cafeína sobre a neuroplasticidade hipocampal

3.3.1 Dano neuronal e sinaptotoxicidade

Neste trabalho, os animais submetidos ao ECI não apresentaram neurodegeneração hipocampal, avaliada pela marcação com o corante fluorescente Fluoro Jade C (FJC). Embora seu mecanismo não esteja bem estabelecido, algumas inferências tem sido feitas relacionando a expressão de moléculas básicas nos neurônios em degeneração e sua alta afinidade pelo ácido forte FJC. Estudos demonstram que o FJC é específico para marcar a degeneração neuronal causada por vários efeitos tóxicos no SNC, marcando poucos elementos não-neuronais mas adjacentes a superfície cerebral como meninges e plexo coróide (Schmued et al., 1997; 2005).

Alguns autores demonstraram que os efeitos prejudiciais do estresse na função cognitiva e no humor são causados pela perda de neurônios hipocampais em decorrência dos altos níveis de glicocorticóides. A atrofia e redução no volume hipocampal está bem relacionada com distúrbios psiquiátricos e é relatada tanto em pacientes com estresse pós traumático e depressão, como em modelos animais de estresse (Lucassen et al. 2001; Sapolsky 2001, Lindauer et al. 2004). No entanto, esta visão é confrontada por trabalhos recentes que não detectaram perda neuronal em animais submetidos a um estresse crônico (Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Sousa et al., 1998) ou ainda tratados com corticosterona (Sousa et al., 1998; Leverenz et al., 1999). Mesmo com a falta de perda neuronal, a exposição crônica ao estresse pode levar a uma redução no volume hipocampal (Sheline et al., 1996). Contudo, este efeito parece ser principalmente devido a redução na plasticidade dos circuitos hipocampais, sobretudo diminuição da arborização dendrítica e perda de sinapses. Esta hipótese é suportada por trabalhos que demonstram uma atrofia dos dendritos apicais da região CA3 do hipocampo após estresse e após administração de corticosterona (Magariños et al 1997, Sousa et al

2000). Além disso, os prejuízos cognitivos causados pelo estresse tanto em roedores quanto em humanos são reversíveis, o que torna pouco provável que sejam causados por perda neuronal, mas sim por alteração nos dendritos, axônios e contatos sinápticos, componentes do circuito hipocampal que apresentam uma alta plasticidade.

As proteínas das vesículas sinápticas tem sido identificadas como possíveis fatores envolvidos na patofisiologia de distúrbios psiquiátricos, incluindo a depressão (Honer et al 1999). Estudos em modelos animais indicaram um aumento nos níveis de sinaptofisina após a terapia eletroconvulsiva, tratamento efetivo para distúrbios depressivos (Jorgensen e Bolwig, 1979). Nossos resultados demonstram que a exposição ao ECI causa uma redução na densidade da proteína sináptica SNAP-25 em sinaptossomas de hipocampo, que foi completamente prevenida pelo tratamento com cafeína. Por outro lado, nem o ECI nem o tratamento com cafeína causaram alterações na densidade da proteína sinaptofisina.

A sinaptofisina é uma proteína localizada nas vesículas sinápticas e envolvida nos processos de fusão das vesículas e exocitose. Sua expressão é comumente utilizada para estimar o número de sinapses funcionais em determinada região do cérebro (Valtorta et al., 2004). A SNAP-25 é uma proteína integral de membrana também associada aos processos de exocitose, no entanto está associada à membrana da pré-sinapse. Seus efeitos biológicos incluem a fusão das vesículas sinápticas, reciclagem de vesículas, extensão de neuritos em processos de reparo e sinaptogênese (Valtorta et al., 2004).

Foi demonstrado que um estresse de imobilização agudo ou de 5 dias reduz a expressão de sinaptofisina no hipocampo e córtex cerebral (Thome et al., 2001). Além disso, o estresse de imobilização por sete dias causa uma redução nos níveis hipocampais de sinaptofisina (Cunha et al., 2006). Contudo, Thome e colaboradores

(2001) observaram que a redução nos níveis de sinaptofisina causada pelo estresse sub-crônico é menos evidente do que aquela induzida pelo estresse agudo. No nosso protocolo, os animais foram submetidos a 21 dias de estresse, e os níveis de sinaptofisina não foram alterados, o que nos leva a sugerir a existência de um mecanismo compensatório em situações de estresse mais prolongadas. Nossos dados reforçam os dados da literatura, demonstrando que as proteínas relacionadas com a exocitose estão alteradas em uma série de distúrbios psiquiátricos (Honer et al 1999). Além disso, pode-se sugerir que estas alterações levam a sinaptotoxicidade.

Foi demonstrado recentemente que o bloqueio dos receptores A_{2A} , principalmente localizados nos terminais sinápticos em estruturas límbicas e corticais, preveniu o efeito do estresse de imobilização sub-crônico em reduzir a densidade de sinaptofisina (Cunha et al., 2006). No nosso modelo de estresse não foram encontradas alterações nos níveis de sinaptofisina. No entanto, o tratamento crônico com cafeína reverteu a redução na densidade de SNAP-25 causada pelo estresse, reforçando a hipótese de que a modulação dos receptores A_{2A} , pode ser particularmente importante na proteção contra as modificações nas sinapses hipocampais causadas pelo estresse crônico. Além disso, a cafeína tem a habilidade de alterar a morfologia dendrítica e induzir a formação de novas espinhas dendríticas em culturas de neurônios (Korkotian e Segal, 1999), sugerindo que sua ação como antagonista de receptores A_{2A} e consequente aumento nos níveis de SNAP-25 pode ser o mecanismo de neuroplasticidade responsável pela melhora na função cognitiva em animais expostos ao estresse.

3.2.2 Reatividade microglial

As células da microglia são as células imunocompetentes do SNC que são rapidamente ativadas principalmente por sinais patológicos. Sua resposta inclui

alterações morfológicas como a transformação de uma forma ramificada para uma forma amebóide, ativada e capaz de desempenhar a atividade fagocitária, proliferação e produção de uma grande variedade de mediadores inflamatórios (para revisão ver Block et al., 2007)

Nossos resultados demonstram que o ECI não provocou reatividade microglial no hipocampo, avaliada através da marcação da proteína CD11b. Não houve ativação microglial, que é evidenciada apenas por alteração de uma morfologia ramificada para um formato amebóide e capaz de realizar fagocitose. Além disso, não houve aumento na imunorreatividade para CD11b, o que pode sugerir ausência de proliferação ou quimiotaxia destas células. Estudos demonstram que os glicocorticóides suprimem a função microglial *in vitro*, diminuindo a capacidade das células microgliais em produzir interferon- γ e TNF α frente a estimulação por LPS (Tanaka et al., 1997). Embora os efeitos imunossupressores dos glicocorticóides estejam bem relatados, recentemente foi sugerido que o estresse de imobilização por seis dias aumenta a proliferação microglial. No entanto, este efeito foi observado apenas no quarto dia de estresse, retornando posteriormente aos níveis basais (Nair e Boneau, 2006). Neste trabalho os animais foram expostos a 21 dias de estresse, fator que pode estar sendo responsável pela ausência de proliferação microglial.

3.3.3. Reatividade astrocitária

Tem sido relatado que alterações gliais podem representar um fator importante nas modificações hipocampais que ocorrem durante o estresse crônico (Lucassen et al., 2001). Os astrócitos possuem um papel importante na regulação de processos fisiológicos e patológicos, especialmente na manutenção da homeostasia cerebral (Kimmelberg e Norenberg, 1989). Muitas evidências tem sugerido que os níveis de

GFAP aumentam junto com a proliferação dos astrócitos e ramificação dos processos astrocíticos, envolvidos no controle e reparo de terminais axônicos em degeneração. Este processo é denominado astrogliose e é observado após vários tipos de dano cerebral, como isquemia, infecção e doenças neurodegenerativas (Eng e Ghimikar, 1994).

Os animais submetidos ao ECI apresentaram um aumento na proliferação de astrócitos apenas nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, avaliada pela marcação da proteína GFAP. Esta é uma proteína de filamentos intermediários de citoesqueleto expressa exclusivamente em astrócitos diferenciados (Bignami et al., 1972). Apesar da grande quantidade de estudos relacionando os efeitos de estresse sobre os neurônios hipocampais, pouco se sabe a respeito dos seus efeitos nas células gliais. Foi demonstrado que o estresse crônico e os altos níveis de glicocorticóides causam uma redução na imunorreatividade de GFAP. Além disso, o tratamento por 12 dias com corticosterona causou uma redução nos níveis de GFAP que foi prevenida pela adrenalectomia (O'Callaghan et al., 1989). No entanto, o oposto também foi relatado. Um estudo recente demonstrou que a administração de corticosterona por 21 dias causa um aumento no número de astrócitos na porção CA1 do hipocampo (Bridges et al., 2008). Além disso, níveis de GFAP aumentados foram encontrados no córtex e na porção CA3 do hipocampo após estresse de imobilização de três semanas. A exposição de ratos a um estresse físico por seis dias também foi capaz de causar um aumento na imunorreatividade para GFAP na porção CA3 do hipocampo (Jang et al., 2008).

De acordo com estes estudos, sugere-se que a resposta dos astrócitos hipocampais ao estresse crônico é similar à resposta gerada por outros insultos e promove a astrogliose reativa. O aumento na proliferação dos astrócitos pode estar relacionado com mecanismos protetores contra o dano neuronal, ou ainda pode expandir

este dano, alterando a comunicação entre neurônios e células gliais e o metabolismo e transporte de substâncias (Syková et al., 2002).

O tratamento com cafeína promoveu uma recuperação da astrocitose provocada pelo estresse crônico tanto na porção CA1 quanto na porção CA3 do hipocampo. No entanto, na região CA1 ela apresentou um efeito *per se*, aumentando a imunorreatividade para GFAP, aspecto que deverá merecer um estudo mais aprofundado.

Conclusões

√ A administração aguda de adenosina produziu uma redução no tempo de imobilidade no TNF, que indica um efeito antidepressivo, o qual foi persistente até 4 horas após administração sistêmica;

√ O aumento dos níveis centrais de adenosina pela administração i.c.v. de dipiridamol produziu um efeito na redução do tempo de imobilidade no TNF semelhante ao efeito da administração sistêmica de adenosina, reforçando a idéia de que a adenosina apresenta um efeito antidepressivo central;

√ O tratamento dos animais por 14 dias com adenosina não produziu efeito no TNF, sugerindo a ocorrência de uma tolerância aos efeitos antidepressivos da adenosina;

√ Os testes farmacológicos sugerem que o efeito da administração aguda de adenosina envolve a inibição de receptores NMDA, inibição da síntese de NO e GMPc e inibição de canais de K⁺.

√ O efeito da administração aguda de adenosina também envolveu uma interação com o sistema serotoninérgico, via receptores 5-HT_{1A} e uma interação com o sistema opióide possivelmente através do aumento da liberação de opióides endógenos e ativação de receptores μ- e δ- opióide.

√ A exposição dos animais ao ECI causou um comportamento tipo depressivo e um prejuízo na memória no labirinto em Y, que foi prevenido pela ingestão crônica de cafeína ou do antagonista seletivo de receptores A_{2A} KW6001, sugerindo que a administração crônica de antagonistas de receptores A_{2A} apresenta um efeito benéfico em um modelo de depressão.

√ Tanto o ECI quanto a ingestão crônica de cafeína causaram um efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado.

√ A ingestão crônica de KW6002 não causou um efeito ansiogênico no labirinto em cruz elevado e preveniu o efeito ansiogênico do ECI.

√ O consumo crônico de cafeína preveniu o aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona induzido pelo ECI, sem prevenir a redução no ganho de peso corporal. Este fato demonstra que o modelo do ECI foi efetivo em produzir uma hipercortisolemia sustentada e que o efeito benéfico da cafeína sobre a depressão e memória pode estar relacionado à redução nos níveis plasmáticos de corticosterona.

√ O ECI não causou neurodegeneração hipocampal ou aumento da reatividade microglial, contudo provocou uma redução na imunorreatividade para SNAP-25, sugerindo uma sinaptotoxicidade, que foi completamente prevenida pela ingestão de cafeína.

√ O ECI causou aumento na imunorreatividade para GFAP, que foi prevenida pela ingestão de cafeína nas porções CA1 e CA3 do hipocampo. Contudo, o tratamento com cafeína *per se* aumentou a imunorreatividade para GFAP na região CA1 do hipocampo.

Perspectivas

- √ Investigar o efeito da administração de adenosina e/ou agonistas adenosinérgicos seletivos no modelo do ECI para caracterizar o efeito diferencial da manipulação aguda e crônica dos receptores adenosinérgicos;
- √ Comparar os efeitos da adenosina e de antagonistas adenosinérgicos como a cafeína e o KW6002 no ECI com os efeitos produzidos por um antidepressivo clássico;
- √ Investigar os efeitos do ECI e do tratamento com agonistas e antagonistas adenosinérgicos na amígdala;
- √ Investigar os efeitos periféricos do ECI e do tratamento com agonistas e antagonistas adenosinérgicos na glândula adrenal e na liberação de catecolaminas e glicocorticóides;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMI, M., BERTORELLI, R., FERRI, N., FODDI, M.C., ONGINI, E. Effects of repeated administration of selective adenosine A₁ and A_{2A} receptor agonists on pentylenetetrazole-induced convulsions in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 294:383-389, 1995.
- AGUILERA, G., KISS, A., LIU, Y., KAMITAKAHARA, A. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. *Stress*, 10:153-161, 2007.
- AHLJANIAN, M.K., TAKEMORI, A.E., 1986. Changes in adenosine receptor sensitivity in morphine-tolerant and -dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236, 615-620.
- AKIL, H., MENG, F., DEVINE, D.P., WATSON, S.J. Molecular and neuroanatomical properties of the endogenous opioid systems: implications for the treatment of opiate addiction. *Semin. Neurosci.*, 9:70-83, 1997.
- AKISKAL, H.S. Mood disorders: introduction and overview. 2000.
- ALANKO, L., PORKKA-HEISKANEN, T., SOINILA, S. Localization of equilibrative nucleoside transporters in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.*, 31:162-168, 2006
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC. 4th ed., 1994.
- ANAND, A., SHEKHAR, A. Brain imaging studies in mood and anxiety disorders: special emphasis on the amygdala. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 985:370-388, 2003.
- ANDERSON, C.M., XIONG, W., YOUNG, J.D., CASS, C.E., PARKINSON, F.E. Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 42:358-361, 1996.
- ANTONIJEVIC, I.A., STEIGER, A. Depression-like changes of the sleep-EEG during high dose corticosteroid treatment in patients with multiple sclerosis. *Psychoneuroendocrinology*, 28:780-795, 2003.
- ARGYROPOULOS, S.V., SANDFORD, J.J., NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: Pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacol. Ther.*, 88:213-227, 2000.
- ARTIGAS, F., ROMERO, L., DE MONTIGNY, C., BLIER, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci.*, 19:378-383, 1996.
- BAAMONDE, A., DAUGE, V., RUIZ-GAYO, M., FULGA, I.G., TURCAUD, S., FOURNIE-ZALUSKI, M.C., ROQUES, B.P. Antidepressant-type effects of endogenous enkephalins protected by systemic RB 101 are mediated by opioid delta and dopamine D₁ receptor stimulation. *Eur. J. Pharmacol.*, 216:157-166, 1992.
- BAILEY, A., DAVIS, L., LESSCHER, H.M., KELLY, M.D., LEDENT, C., HOURANI, S.M., KITCHEN, I. Enhanced morphine withdrawal and mu-opioid receptor G-protein coupling in A_{2A} adenosine receptor knockout mice. *J. Neurochem.*, 88:827-834, 2004.

- BALDESSARINI, R.J. Current status of antidepressants: clinical pharmacology and therapy. *J. Clin. Psychiatry*, 50:117-126, 1989.
- BALDWIN, H.A., FILE, S.E. Caffeine-induced anxiogenesis: the role of adenosine, benzodiazepine and noradrenergic receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 32:181-186, 1989.
- BALLENGER, J.C. Clinical guidelines for establishing remission in patients with depression and anxiety. *J. Clin. Psychiatry*, 60:29-34, 1999.
- BARRACO, R.A., MARCANTONIO, D.R., PHILLIS, J.W., CAMPBELL, W.R. The effects of parenteral injections of adenosine and its analogs on blood pressure and heart rate in the rat. *Gen. Pharmacol.*, 18:405-416, 1987.
- BARRY, U., ZUO, Z. Opioids: old drugs for potential new applications. *Curr. Pharm. Des.*, 11: 1343-1350, 2005.
- BELANOFF, J.K., ROTHSCHILD, A.J., CASSIDY, F., DEBATTISTA, C., BAULIEU, E.E., SCHOLD, C. An open label trial of C-1073 (mifepristone) for psychotic major depression. *Biol. Psychiatry*, 52:386-392, 2002.
- BERMAN, R.M., CAPPIELLO, A., ANAND, A., OREN, D.A., HENINGER, G.R., CHARNEY, D.S., KRISTAL, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry*, 47:351-354, 2000.
- BERROCOSO, E., ROJAS-CORRALES, M.O., MICÓ, J.A. Non-selective opioid receptor antagonism of the antidepressant-like effect of venlafaxine in the forced swimming test in mice. *Neurosci. Lett.*, 363:25-28, 2004.
- BHATTACHARYA, S.K., SATYAN, K.S., CHAKRABARTI, A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J. Psychopharmacol.*, 11:219-224, 1997.
- BINDOKAS, V.P., JORDAN, J., LEE, C.C., MILLER, R.J. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.*, 16:1324-1336, 1996.
- BLOCK, M.L., ZECCA, L., HONG, J.S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8:57-69, 2007.
- BLIER, P., DE MONTIGNY, C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15:220-226, 1994.
- BLIER, P., WARD, N.M. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol. Psychiatry*, 53:193-203, 2003.
- BLUM, D., HOUREZ, R., GALAS, M., POPOLI, P., SCHIFFMANN, S.N. Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics. *The Lancet Neurology*, 2:366-374, 2003.
- BODKIN, J.A., ZORNBERG, G.L., LUKAS, S.E., COLE, J.O. Buprenorphine treatment of refractory depression. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 15:49-57, 1995.
- BOEHNING, D., SNYDER, S.H. Novel neural modulators. *Annu. Rev. Neurosci.*, 26:105-131, 2003.

- BONATI, M., LATINI, R., GALLETI, F., YOUNG, J.F., TOGNONI, G., GARATTINI, S. Caffeine disposition after oral doses. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 32:98-106, 1982.
- BONIZZONI, E., MILANI, S., ONGINI, E., CASATI, C., MONOPOLI, A. Modeling hemodynamic profiles by telemetry in the rat. A study with A₁ and A_{2A} adenosine agonists. *Hypertension*, 25:564-569, 1995.
- BORNSTEIN, S.R., SCHUPPENIES, A., WONG, M.L., LICINIO, J. Approaching the shared biology of obesity and depression: the stress axis as the locus of gene-environment interactions. *Mol. Psychiatry*, 11:892-902, 2006.
- BORSINI, F. Role of the serotonergic system in the forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 19:377-395, 1995.
- BOYER, P.A., SKOLNICK, P., FOSSOM, L.H. Chronic administration of imipramine and citalopram alters the expression of NMDA receptor subunit mRNAs in mouse brain. A quantitative in situ hybridization study. *J. Mol. Neurosci.*, 10:219-233, 1998.
- BOURIN, M., MASSE, F., HASCOËT, M. Evidence for the activity of lamotrigine at 5-HT_{1A} receptors in the mouse forced swimming test. *J. Psychiatry Neurosci.*, 30:275-282, 2005.
- BRENMAN, J.E., CHRISTOPHERSON, K.S., CRAVEN, S.E., MCGEE, A.W., BREDDT, D.S. Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J. Neurosci.*, 16:7407-7415, 1996.
- BRIDGES, N., SLAIS, K., SYKOVÁ, E. The effects of chronic corticosterone on hippocampal astrocyte numbers: A comparison of male and female Wistar rats. *Acta. Neurobiol. Exp.*, 68:131-138, 2008.
- BRINK, C.B., HARVEY, B.H., BRAND, L. Tianeptine: a novel atypical antidepressant that may provide new insights into the biomolecular basis of depression. *Recent Patents CNS Drug Discov.*, 1:29-41, 2006.
- BROWN, E.S., SUPPES, T. Mood symptoms during corticosteroid therapy: a review. *Harv. Rev. Psychiatry*, 5:239-246, 1998.
- BROWN, E.S., CHAMBERLAIN, W., DHANANI, N., PARANJPE, P., CARMODY, T.J., SARGEANT, M. An open-label trial of olanzapine for corticosteroid-induced mood symptoms. *J. Affect. Disord.*, 83:277-281, 2004.
- BRUNDEGE, J.M., DUNWIDDIE, T.V. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Adv. Pharmacol.*, 39:353-391, 1997.
- BURNSTOCK, G., CAMPBELL, G., SATCHELL, D., SMYTHE, A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br. J. Pharmacol.*, 40:668-688, 1970.
- BURNSTOCK, G., COCKS, T., CROWE, R., KASAKOV, L. Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.*, 63:125-138, 1978.

CALABRESE, J.R., BOWDEN, C.L., SACHS, G.S., ASCHER, J.A., MONAGHAN, E., RUDD, G.D. A double-blind placebo-controlled study of lamotrigine monotherapy in outpatients with bipolar I depression. Lamictal 602 Study Group, *Clin. Psychiatry*, 60:79–88, 1999.

CASOROTTO, P.C., ANDREATINI, R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 17:735-42, 2007.

CASTRO, L., RODRIGUEZ, M., RADI, R. Aconitase is readily inactivated by peroxy-nitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 269:29409-29415, 1994.

CELADA, P., PUIG, V.M., AMARGÓS-BOSCH, M., ADELL, A., ARTIGAS, F. The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *J. Psychiatry. Neurosci.*, 29:252-265, 2004.

CHAKRABARTI, A. Anxiogenic action of caffeine: an experimental study in rats. *J Psychopharmacol*, 11:219-224, 1997.

CHAPUT, Y., BLIER, P., DE MONTIGNY, C. In vivo electrophysiological evidence for the regulatory role of autoreceptors on serotonergic terminals. *J. Neurosci.*, 6:2796-2801, 1986.

CHARNEY, D.S., MANJI, H.K. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci. STKE.*, 225, 2004.

CHAU, A., ROSE, J.C., KOOS, B.J. Adenosine modulates corticotropin and cortisol release during hypoxia in fetal sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 180:1272-1277, 1999.

CHEN, N., MOSHAVER, A., RAYMOND, L.A. Differential sensitivity of recombinant N-methyl-d-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol. Pharmacol.*, 51:1015-1023, 1997.

CHEN, Y.C., HUANG, S.H., WANG, S.M. Adenosine-stimulated adrenal steroidogenesis involves the adenosine A_{2A} and A_{2B} receptors and the Janus kinase 2-mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *In press*, doi:10.1016/j.biocel.2008.05.016, 2008.

CHIAVEGATTO, S., DAWSON, V.L., MAMOUNAS, L.A., KOLIATSOS, V.E., DAWSON, T.M., NELSON, R.J. Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:1277-1281, 2001.

CHOI, J.S., CHOI, B.H., AHN, H.S., KIM, M.J., HAN, T.H., RHIE, D.J. Fluoxetine inhibits A-type potassium currents in primary cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.*, 1018:201–207, 2004.

CONSONI, F.T., VITAL, M.A., ANDREATINI, R. Dual monoamine modulation for the antidepressant-like effect of lamotrigine in the modified forced swimming test. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 16:451-458, 2006.

COPPEN, A. Indoleamines and affective disorders. *J. Psych. Res.*, 9:163-171, 1972.

CRYAN, J.F., MARKOU, A., LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.*, 23: 238-245, 2002.

CUNHA, R.A., JOHANSSON, B., VAN DER PLOEG, I. Evidence for functionally important adenosine A_{2A} receptors in the rat hippocampus. *Brain Res.*, 649:208-216, 1994.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.*, 38:107-25, 2001.

CUNHA, R.A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A₁ receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signal.*, 1:111-134, 2005.

CUNHA, G.M., CANAS, P.M., OLIVEIRA, C.R., CUNHA, R.A. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A_{2A} receptors upon sub-chronic restraint stress. *Neuroscience*, 141:1775-1781, 2006.

CUNHA, R.A., FERRÉ S., VAGEOIS, J.M., CHEN, J.F. Potential therapeutic interest of adenosine A_{2A} receptors in psychiatric disorders. *Curr. Pharm. Des.*, 14:1512-1524, 2008.

DA CUNHA, C., GEVAERD, M.S., VITAL, M.A., MIYOSHI, E., ANDREATINI, R., SILVEIRA, R., TAKAHASHI, R.N., CANTERAS, N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav. Brain Res.* 124:9-18, 2001.

DALLMAN, M.F., PECORARO, N.C., LA FLEUR S.E. Chronic stress and comfort foods: selfmedication and abdominal obesity. *Brain Behav. Immun.*, 19:275-280, 2005.

DALY, J.W. Caffeine analogs: biomedical impact. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 642:153-169, 2007.

D'AQUILA, P., BRAIN, P.F., WILLNER, P. Effects of chronic mild stress in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol. Behav.*, 56:861-867, 1994.

DARKO, D.F., RICH, S.C., GILIN, J.C., GOLSHAN, S. Association of β -endorphin with specific clinical symptoms of depression. *Am. J. Psychiatry*, 149:1162-1167, 1992.

DA SILVA, G.D., MATTEUSSI, A.S., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B., RODRIGUES, A.L.S. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport*, 11: 3699-702, 2000.

DAWSON, V.L., DAWSON. T.M., UHL. G.R., SNYDER. S.H. Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3256-3259, 1993.

DECKERT, J., GLEITER, CH. Adenosinergic psychopharmaceuticals? *Trends Pharmacol. Sci.*, 10:99-100, 1989.

DE FELIPE, M.C., JIMENEZ, I., CASTRO, A., FUENTES, J.A. Antidepressant action of imipramine and iprindole in mice is enhanced by inhibitors of enkephalin-degrading peptidases. *Eur. J. Pharmacol.*, 159:175-180, 1989.

DELLU, F., MAYO, W., CHERKAOUI, J., LE MOAL, M., SIMON, H. A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Res.*, 588:132-139, 1992.

- DE MENDONÇA, A., SEBASTIÃO, A.M., RIBEIRO, J.A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res. Rev.* 33:258-274, 2000.
- DENNINGER, J.W., MARLETTA, M.A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411:334-350, 1999.
- DE VRY, J., SCHREIBER, R., MELON, C., DALMUS, M., JENTZSCH, K.R. 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 14:487-495, 2004.
- DHIR, A., KULKARNI, S.K. Possible involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant-like effect of MK-801(dizocilpine), a NMDA receptor antagonist in mouse forced swim test. *Indian J. Exp. Biol.*, 46:164-170, 2008.
- DRURY, A.N., SZENT-GYÖRGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.*, 68:213-237, 1929.
- DUGAN, L.L., SENSI, S.L., CANZONIERO, L.M., HANDRAN, S.D., ROTHMAN, S.M., LIN, T.S., GOLDBERG, M.P., CHOI, D.W. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.*, 15:6377-6388, 1995.
- DUMAN, R.S. Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur. Psychiatry.*, 17:306-310, 2002.
- DUMAN, R.S., MONTEGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders, *Biol. Psychiatry*, 59:1116-1127, 2006.
- ECKELI, A.L., DACH, F., RODRIGUES, A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. *Neuroreport*, 11:1839-43, 2000.
- ELGÜN, S., KESKINEGE, A., KUMBASAR, H. Dipeptidil peptidase IV and adenosine deaminase activity decrease in depression. *Psyconeuroendocrinology*, 24:823-832, 1999.
- ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28: 435-451, 2004.
- EL YACOUBI, M., LEDENT, C., MÉNARD, J.F., PARMENTIER, M., COSTENTIN, J., VAUGEOIS, J.M. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A_{2A} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129:1465-73, 2000.
- EL YACOUBI, M., LEDENT, C., PARMENTIER, M., COSTENTIN, J., VAUGEOIS, J.M. The anxiogenic-like effect of caffeine in two experimental procedures measuring anxiety in the mouse is not shared by selective A_{2A} adenosine receptor antagonists. *Psychopharmacology*, 148:153-163, 2000.
- EL YACOUBI, M., LEDENT, C., PARMENTIER, M., BERTORELLI, R., ONGINI, E., COSTENTIN, J., VAUGEOIS, J.M. Adenosine A_{2A} receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A_{2A} receptor knockout mice, *Br. J. Pharmacol.*, 134:68-77, 2001.

EL YACOUBI, M., COSTENTIN, J., VAUGEOIS, J.M. Adenosine A_{2A} receptors and depression. *Neurology*, 61:82–87, 2003.

ENG, L.F., GHIRNIKAR, R.S. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 4:229-237, 1994.

ENRÍQUEZ-CASTILLO, A., ALAMILLA, J., BARRAL, J., GOURBIÈRE, S., FLORES-SERRANO, A.G., GÓNGORA-ALFARO, J.L., PINEDA, J.C. Differential effects of caffeine on the antidepressant-like effect of amitriptyline in female rat subpopulations with low and high immobility in the forced swimming test. *Physiol., Behav.*, 94:501-509, 2008.

EVONIUK G, VON BORSTEL RW, WURTMAN RJ. Antagonism of the cardiovascular effects of adenosine by caffeine or 8-(p-sulfophenyl)theophylline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240:428-432, 1987.

FASTBOM, J., PAZOS, A., PALACIOS, J.M. The distribution of adenosine A₁ receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience*, 22:813-826, 1987.

FERRÉ S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J. Neurochem.*, 105:1067-1079, 2008.

FERRENDELLI, J.A., CHANG, M.M., KINSCHERF, D.A. Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. *J. Neurochem.*, 22:535–540, 1974.

FERRENDELLI, J.A., RUBIN, E.H., KINSCHERF, D.A. Influence of divalent cations on regulation of cyclic GMP and cyclic AMP levels in brain tissue. *J. Neurochem.*, 26:741–748, 1976.

FLORIO, C., PREZIOSO, A., PAPAIOANNOU, A., VERTUA, R. Adenosine A₁ receptors modulate anxiety in CD1 mice. *Psychopharmacology*, 136:311–319, 1998.

FREDHOLM, B.B., LERNER, U. Metabolism of adenosine and 2'-deoxy-adenosine by fetal mouse calvaria in culture. *Med. Biol.*, 60:267-71, 1982.

FREDHOLM, B.B., BÄTTIG, K., HOLMÉN, J., NEHLIG, A., ZVARTAU, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.*, 51:83-133, 1999.

FREDHOLM, B.B., IJZERMAN, A.P., JACOBSON, K.A., KLOTZ, K., LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.*, 53:527-552, 2001.

FREDHOLM, B.B. Adenosine receptors as targets for drug development. *Drug News Perspect.*, 16:283-289, 2003.

FREDHOLM, B.B., CHEN, J.F., CUNHA, R.A., SVENNINGSSON, P., VAUGEOIS, J.M. Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.*, 63:191-270, 2005.

FREDHOLM BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.*, 14:1315-1323, 2007.

GALEOTTI, N., GHELARDINI, C., CALDARI, B., BARTOLINI, A. Effect of potassium channel modulators in mouse forced swimming test. *Br. J. Pharmacol.*, 126:1653–1659, 1999.

GARRET, B.E., HOLTZMAN, S.G. Does adenosine receptor blockade mediate caffeine-induced rotational behavior? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 274:207–214, 1995.

GARTHWAITE, J., BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.*, 57:683-706, 1995.

GEREVICH, G., WIRKNER, K., ILLES, P. Adenosine A_{2A} receptors inhibit the N-methyl-D-aspartate component of excitatory synaptic currents in rat striatal neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 451:161-164, 2002.

GHADIRIAN, A.M., GIANOULAKIS, C.H., NAIR, N.P. The effect of electroconvulsive therapy on endorphins in depression. *Biol. Psychiatry*, 23:459-464, 1988.

GIMÉNEZ-LLORT, L., SCHIFFMANN, S.N., SHMIDT, T., CANELA, L., CAMÓN, L., WASSHOLM, M., CANALS, M., TERASMAA, A., FERNÁNDEZ-TERUEL, A., TOBEÑA, A., POPOVA, E., FERRÉ, S., AGNATI, L., CIRUELA, F., MARTÍNEZ, E., SCHEEL-KRUGER, J., LUIS, C., FRANCO, R., FUXE, K., BADER, M. Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A_{2A} receptors in the brain. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87:42-56, 2007.

GOLD, P.W., CHROUSOS, G.P. The endocrinology of melancholic and atypical depression: relation to neurocircuitry and somatic consequences. *Proc. Assoc. Am. Physicians.*, 111:22-34, 1999.

GOŁEMBIOWSKA, K., DZIUBINA, A. Effect of acute and chronic administration of citalopram on glutamate and aspartate release in the rat prefrontal cortex. *Pol. J. Pharmacol.*, 52:441-448, 2000.

GORDON, J.A., HEN, R. TREKking toward new antidepressants. *Nat. Neurosci.*, 9:1081-3, 2006.

GOVINDARAJAN, A., RAO, B.S., NAIR, D., TRINH, M., MAWJEE, N., TONEGAWA, S., CHATTARJI, S. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:13208–13213, 2006.

GRIEBEL, G., SIMIAND, J., STEINBERG, R., JUNG, M., GULLY, D., ROGER, P. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1,3 thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotrophin-releasing factor(1) receptor antagonist II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 30:333–345, 2002.

GUNTER, T.E., GUNTER, K.K., SHEU, S.S., GAVIN, C.E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.*, 267:313-339, 1994.

GUO, W.Y., TODD, K.G., BOURIN, M., HASCOET, M. The additive effects of quinine on antidepressant drugs in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology*, 121:173–179, 1995.

GUO, W., TODD, K., BOURIN, M., HASCOET, M., KOUADIO, F. Additive effects of glyburide and antidepressants in the forced swimming test: evidence for the involvement of potassium channel blockade. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54, 725–730, 1996.

HACK, S.P., CHRISTIE, M.J. Adaptations in adenosine signaling in drug dependence: therapeutic implications. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 15:235-274, 2003.

HALL, C.S. Emotional behaviour in the rat: III The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J. Comp. Psychol.*, 22:345–352, 1936.

HARKIN, A.J., BRUCE, K.H., CRAFT, B., PAUL, I.A. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur. J. Pharmacol.*, 372:207-213, 1999.

HARKIN, A.J., CONNOR, T.J., WALSH, M., ST JOHN, N., KELLY, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology*, 44:616-623, 2003.

HARKIN, A.J., CONNOR, T.J., BURNS, M.P., KELLY, J.P. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 14:274-281, 2004.

HARRIS, E.C., BARRACLOUGH, B. Excess mortality of mental disorder. *Br. J. Psychiatry.*, 173:11-53, 1998.

HEIBERG, I.L., WEGENER, G., ROSENBERG, R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav. Brain Res.* 134:479-484, 2002.

HENN, F.A., VOLLMAYR, B. Neurogenesis and depression: etiology or epiphenomenon? *Biol. Psychiatry.*, 56:146-150, 2004.

HENSLER, J.G. Differential regulation of 5-HT_{1A} receptors-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacology*, 26:565-573, 2000.

HERIN, G.A., AIZENMAN, E. Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur. J. Pharmacol.*, 500:101-111, 2004.

HERMAN, J.P., PREWITT, C.M., CULLINAN, W.E. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 10:371-394, 1996.

HEURTEAUX, C., LUCAS, G., GUY, N, EL YACOUBI, M., THÜMMLER, S., PENG, X.D., NOBLE, F., BLONDEAU, N., WIDMANN, C., BORSOTTO, M., GOBBI, G., VAUGEOIS, J.M., DEBONNEL, G., LAZDUNSKI, M. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.*, 9:1134-1141, 2006.

HOLMES, A., MURPHY, D.L., CRAWLEY, J.N. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. *Biol. Psychiatry*, 54:953-959, 2003.

HOLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends in Neurosc.*, 20:298-303, 1997.

HOLTON, F.A., HOLTON, P. The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J. Physiol.*, 119:50-51, 1953.

HONER, W.G., FALKAI, P., CHEN, C., ARANGO, V., MANN, J.J., DWORK, A.J. Synaptic and plasticity-associated proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness. *Neuroscience*. 91:1247-1255, 1999.

HU, K., HUANG, C.S., JAN, Y.N., JAN, L.Y. ATP-sensitive potassium channel traffic regulation by adenosine and protein kinase C. *Neuron*. 38:417-432, 2003.

IMAZUMI, M., MIYAZAKI, S., ONODERA, K. Effects of xanthine derivatives in a light/dark test in mice and the contribution of adenosine receptors. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 16:639-644, 1994.

INAN, S.Y., YALCIN, I., AKSU, F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide-mediated serotonin release and potassium channel modulation. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 77:457-464, 2004.

JACOBSEN, J.P., WEIKOP, P., HANSEN, H.H., MIKKELSEN, J.D., REDROBE, J.P., HOLST, D., BOND, C.T., ADELMAN, J.P., CHRISTOPHERSEN, P., MIRZA, N.R. SK3 K⁺ channel deficient mice have enhanced dopamine and serotonin release and altered emotional behaviors. *Genes Brain Behav.*, in press, 2008.

JACOBSON, K.A., VON LUBITZ, D.K., DALYM, J.W., FREDHOLMM B.B. Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17:108-113, 1996.

JACOBS, B.L., AZMITIA, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.*, 72:165-229, 1992.

JAIN, N., KEMP, N., ADEYEMO, O., BUCHANAN, P., STONE, T.W. Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 116:2127-2133, 1995.

JANG, S., SUH, S.H., YOO, H.S., LEE, Y.M., OH, S. Changes in iNOS, GFAP and NR1 expression in various brain regions and elevation of sphingosine-1-phosphate in serum after immobilized stress. *Neurochem Res.*, 33:842-851, 2008.

JOELS, M., KARST, H., ALFAREZ, D., HEINE, V.M., QIN, Y., VAN RIEL, E., VERKUYL, M., LUCASSEN, P.J., KRUGERS, H.J. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. *Stress.*, 7:221-231, 2004.

JOHNSON, J.W., ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325:529-531, 1987.

JORGENSEN, O.S., BOLWIG, T.G. Synaptic proteins after electroconvulsive stimulation. *Science* 205:705-707, 1979.

- KAPLAN, G.B., LEITE-MORRIS, K.A., SEARS, M.T. Alterations of adenosine A₁ receptors in morphine dependence. *Brain Res.* 657:347-350, 1994.
- KAPLAN, G.B., SEARS, M.T. Adenosine receptor agonists attenuate and adenosine receptor antagonists exacerbate opiate withdrawal signs. *Psychopharmacology*, 123:64-70, 1996.
- KAROLEWICZ, B., PAUL, I.A., ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. Effect of NOS inhibitor on forced swim test and neurotransmitters turnover in the mouse brain. *Pol. J. Pharmacol.*, 53:587-96, 2001.
- KASE, H., AOYAMA, S., ICHIMURA, M., IKEDA, M., ISHII, A., KANDA, T. Progress in pursuit of therapeutic A_{2A} antagonists: the adenosine A_{2A} receptor selective antagonist KW6002: research and development toward a novel nondopaminergic therapy for Parkinson's disease. *Neurology*, 61:97-100, 2003.
- KASTER, M.P., ROSA, A.O., ROSSO, M.M., GOULART, E.C., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A₁ and A_{2A} receptors. *Neurosci. Lett.*, 355:21-24, 2004.
- KASTER, M.P., RAUPP, I., BINFARÉ, R.W., ANDREATINI, R., RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur. J. Pharmacol.*, 565:19-24, 2007.
- KATZ, R.J., ROTH, K.A., SCHMALTZ, K. Amphetamine and tranylcypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 5:259-264, 1981.
- KESSLER, R.C., ZHAO, S., BLAZER, D.G., SWARTZ, M. Prevalence, correlates, and course of minor depression and major depression in the National Comorbidity Survey. *J. Affect. Disord.*, 45:19-30, 1997.
- KESSLER, R.C., WALTERS, E.E. Epidemiology of DSM-III-R major depression and minor depression among adolescents and young adults in the National Comorbidity Survey. *Depress Anxiety*, 7:3-14, 1998.
- KLINE, N.S., LI, C.H., LEHMAN, H.L., LAJTA, A., LASKI, E., COOPER, T. Beta endorphine-induced changes in schizophrenics and depressed patients. *Arch. Gen. Psychiatry*, 34:1111-1113, 1977.
- KLOET, E.R., JOËLS, M., HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6:463-475, 2005.
- KORKOTIAN, E., SEGAL, M. Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:12068-12072, 1999.
- KORNHUBER, J., WELLER, M. Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol. Psychiatry.*, 41:135-44, 1997.
- KIMELBERG, H.K., NOREMBERG, M.D. Astrocytes. *Sci. Am.*, 260:66-72, 1989.

- KUGAYA, A., SANACORA, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr.*, 10:808-819, 2005.
- KUBERA, M., MAES, M., HOLAN, V., BASTA-KAIM, A., ROMAN, A., SHANI, J. Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an anti-inflammatory cytokine, in C57BL6 mice subjected to the chronic mild stress model of depression. *J. Affect. Disord.*, 63:171-178, 2001.
- KULKARNI SK, MEHTA AK. Purine nucleoside--mediated immobility in mice: reversal by antidepressants. *Psychopharmacology*, 85:460-463, 1985.
- LANDÉN, M., THASE, M.E. A model to explain the therapeutic effects of serotonin reuptake inhibitors: the role of 5-HT₂ receptors. *Psychopharmacol. Bull.*, 39:147-166, 2006.
- LANFUMEY, L., HAMON, M. 5-HT₁ receptors. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 3:1-10, 2004.
- LANG, U.E., LANG, F., RICHTER, K., VALLON, V., LIPP, H.P., SCHNERMANN, J., WOLFER, D.P. Emotional instability but intact spatial cognition in adenosine receptor 1 knock out mice. *Behav. Brain Res.*, 145:179-188, 2003.
- LARA, D.R., DALL'IGNA, O.P., GHISOLFI, E.S., BRUNSTEIN, M.G. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 30:617-629, 2006.
- LATINI, S., PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.*, 79:463-484, 2001.
- LAURSEN, S.E., BELKNAP, J.K. Intracerebroventricular injections in mice Some methodological refinements, *J Pharmacol Methods*. 16:355-357, 1986.
- LEDOUX, J. The emotional brain, fear and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol.*, 23:727-38, 1995.
- LEE, Y.C., CHIEN, C.L., SUN, C.N., HUANG, C.L., HUANG, N.K., CHIANG, M.C., LAI, H.L., LIN, Y.S., CHOU, S.Y., WANG, C.K., TAI, M.H., LIAO, W.L., LIN, T.N., LIU, F.C., CHERN, Y. Characterization of the rat A_{2A} adenosine receptor gene: a 4.8-kb promoter-proximal DNA fragment confers selective expression in the central nervous system. *Eur. J Neurosci.*, 18:1786-1796, 2003.
- LEMKE, M.R. Depressive symptoms in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.*, 15:21-25, 2008.
- LEMONDE, S., TURECKI, G., BAKISH, D., DU, L., HRDINA, P.D., BOWN, C.D., SEQUEIRA, A., KUSHWAHA, N., MORRIS, S.J., BASAK, A., OU, X.M., ALBERT, P.R. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J. Neurosci.*, 23:8788-8799, 2003.
- LEVIN, B.E., RICHARD, D., MICHEL, C., SERVATIUS, R. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279:1357-1364, 2000.

- LEVERENZ, J. B., WILKINSON, C. W., WAMBLE, M., CORBIN, S., GRABBER, J. E., RASKIND, M. A., PESKIND, E. R. Effect of chronic high-dose exogenous cortisol on hippocampal neuronal number in aged nonhuman primates. *J. Neurosci.*, 19:2356–2361, 1999
- LINDAUER, R.J., VLIEGER, E.J., JALINK, M., OLFF, M., CARLIER, I.V., MAJOIE, C.B., DEN HEETEN, G.J., GERSONS, B.P. Smaller hippocampal volume in Dutch police officers with posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry*, 56:356-363, 2004.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92:180-5, 1987.
- LLOYD, H.G., SCHRADER, J. Adenosine metabolism in the guinea pig heart: the role of cytosolic S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, 5'-nucleotidase and adenosine kinase. *Eur. Heart J.*, 14:27-33, 1993.
- LÓPEZ, J.F., AKIL, H., WATSON, S.J. Role of biological and psychological factors in early development and their impact on adult life: neural circuits mediating stress. *Biol. Psychiatry*, 46:1461-1471, 1999.
- LOPES, L.V., CUNHA, R.A., KULL, B. et al. Adenosine A_{2A} receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on the tonic A₁ receptor inhibition. *Neuroscience*, 112:319-329, 2002.
- LOW, C.M., ZHENG, F., LYUBOSLAVSKY, P., TRAYNELIS, S.F. Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:11062–11067, 2000.
- LU, X.Y., KIM, C.S., FRAZER, A., ZHANG, W. Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:1593-1598, 2006.
- LUCASSEN, P.J., VOLLMANN-HONSDORF, G.K., GLEISBERG, M., CZÉH, B., DE KLOET, E.R., FUCHS, E. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *Eur. J. Neurosci.*, 14:161-166, 2001.
- LUCASSEN, P.J., HEINE, V.M., MULLER, M.B., VAN DER BEEK, E.M., WIEGANT, V.M., DE KLOET, E.R., JOELS, M., FUCHS, E., SWAAB, D.F., CZEH, B. Stress, depression and hippocampal apoptosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.*, 5:531-546, 2006.
- LUINE, V., VILLEGAS, M., MARTINEZ, C., MCEWEN, B.S. Stress-dependent impairments of spatial memory. Role of 5-HT. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 746:403-404, 1994.
- LUSCOMBE, G.P., MARTIN, K.F., HUTCHINS, L.J., GOSDEN, J., HEAL, D.J. Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 108:669–677, 1993.
- MACKINNON, R. Potassium channels, *FEBS Lett.*, 555:62–65, 2003.
- MAGARIÑOS, A. M., MCEWEN, B.S. Stress induced atrophy of the apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons: comparisons of stressors. *Neuroscience*, 69:83–88, 1995.

MAGARIÑOS, A. M., VERDUGO, J. M. G., MCEWEN, B. S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:14002–14008, 1997.

MAGUE, S.D., PLIAKAS, A.M., TODTENKOPF, M.S., TOMASIEWICZ, H.C., ZHANG, Y., STEVENS, W.C., JONES, R.M., PORTOGHESE, P.S., CARLEZON, W.A. Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305:323-330, 2003.

MAIA, L., DE MENDONÇA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur. J. Neurol.*, 9:377-382, 2002.

MAKINO, M., KITANO, Y., KOMIYAMA, C., HIROHASHI, M., TAKASUNA, K. Involvement of central opioid systems in human interferon-alpha induced immobility in the mouse forced swimming test. *Br. J. Pharmacol.*, 130:1269-74, 2000.

MANJI, H.K., QUIROZ, J.A., SPORN, J., PAYNE, J.L., DENICOFF, K.A., GRAY, N., ZARATE, C.A. Jr., CHARNEY, D.S. Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol. Psychiatry*. 53:707-42, 2003.

MANSOUR, A., KHACHATURIAN, H., LEWIS, M.E., AKIL, H., WATSON, S.J. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.*, 11:308–314, 1988.

MAREK, G.J., CARPENTER, L.L., MCDOUGLE, C.J., PRICE, L.H. Synergistic action of 5-HT_{2A} antagonists and selective serotonin reuptake inhibitors in neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, 28:402-412, 2003.

MARTÍN, E.D., BUÑO, W. Caffeine-mediated presynaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, 89:3029-3038, 2003.

MARVANOVA, M., WONG, G. Adenosine A_{2A} receptor mRNA expression is increased in rat striatum and nucleus accumbens after memantine administration. *Mol. Brain Res.*, 120:193-196, 2003.

MASLOVA, L.N., BULYGINA, V.V., MARKEL, A.L. Chronic stress during prepubertal development: immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 27:549–561, 2002.

MAZE M, FUJINAGA M. Recent advances in understanding the actions and toxicity of nitrous oxide. *Anaesthesia*, 55:311-314, 2000.

McARTHUR, R., BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 84:436-452, 2006.

McBAIN, C.J., KLECKNER, N.W., WYRICK, S., DINGLELINE, R. Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-d-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.*, 36:556–565, 1989.

McGEHEE, D.S. GIRK channels as a target for SSRIs. Focus on "reduced 5-HT_{1A}- and GABA_B receptor function in dorsal raphe neurons upon chronic fluoxetine treatment of socially stressed rats". *J. Neurophysiol.*, 98:1-2, 2007

- MILLAN, M.J. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol. Ther.*, 110:135-370, 2006.
- MOLINOFF, P.B., WILLIAMS, K., PRITCHETT, D.B., ZHONG, J. Molecular pharmacology of NMDA receptors: modulatory role of NR2 subunits. *Prog. Brain. Res.*, 100:39-45, 1994.
- MONTAGUE, P.R., GANCAICO, C.D., WINN, M.J., MARCHASE, R.B., FRIEDLANDER, M.J. Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science*, 263:973-977, 1994.
- MOREAU, J.L., SCHERSCHLICH, R., JENCK, F., MARTIN, J.R. Chronic mild stress-induced anhedonia model of depression: REM sleep abnormalities and curative effects of electroshock treatment. *Behav. Pharmacol.*, 6:682-687, 1995.
- MURPHY, B.E., FILIPINI, D., GHADIRIAN, A.M. Possible use of glucocorticoid receptor antagonists in the treatment of major depression: preliminary results using RU 486. *J. Psychiatry Neurosci.*, 18:209-213, 1993.
- MURRAY, C.J., LOPEZ, A.D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349:1436-1442, 1997.
- MUSSELMAN, D.L., EVANS, D.L., NEMEROFF, C.B. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55:580-92, 1998.
- NAIR, A., BONNEAUM R.H. Stress-induced elevation of glucocorticoids increases microglia proliferation through NMDA receptor activation. *J. Neuroimmunol.* 171:72-85, 2006.
- NELSON, J.C. Safety and tolerability of the new antidepressants. *J. Clin. Psychiatry.*, 6:26-31, 1997.
- NEMEROFF, C.B., EVANS, D.L. Correlation between the dexamethasone suppression test in depressed patients and clinical response. *Am. J. Psychiatry*, 141:247-249, 1984.
- NEMEROFF, C.B., OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. *Nat. Neurosci.*, 5:1068-1070, 2002.
- NESTLER, E.J., BARROT, M., DILEONE, R.J., EISCH, A.J., GOLD, S.J., MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34:13-25, 2002a.
- NESTLER, E.J., GOULD, E., MANJI, H., BUCAN, M., DUMAN, R.S., GERSHENFELD, H.K., HEN, R., KOESTER, S., LEDERHENDLER, I., MEANEY, M.J., ROBBINS, T., WINSKY, L., ZALCMAN, S. Preclinical models: Status of basic research in depression. *Biol. Psychiatry*, 52:503-528, 2002b.
- NICHOLLS, D.G. A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog. Brain Res.*, 63:97-106, 1985.
- NICHOLSON, S.A. Stimulatory effect of caffeine on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the rat. *J. Endocrinol.*, 122:535-543, 1989.

NOWAK, G., TRULLAS, R., LAYER, R.T., SKOLNICK, P., PAUL, I.A. Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265:1380-1386, 1993.

O'DWYER, A.M., LIGHTMAN, S.L., MARKS, M.N., CHECKLEY, S.A. Treatment of major depression with metyrapone and hydrocortisone. *J. Affect Disord.*, 33:123-128, 1995.

OKADA, M., KAWATA, Y., KIRYU, K., MIZUNO, K., WADA, K., TASAKI, H., KANEKO, S. Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. *J. Neurochem.*, 69:2581-2588, 1997.

OKADA, M., KAWATA, Y., MURAKAMI, T., WADA, K., MIZUNO, K., KANEKO, S. Interaction between purinoceptor subtypes on hippocampal serotonergic transmission using in vivo microdialysis. *Neuropharmacology*, 38:707-715, 1999.

OKADA, M., NUTT, D.J., MURAKAMI, T., ZHU, G., KAMATA, A., KAWATA, Y., KANEKO, S. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J. Neurosci.*, 21:628-640, 2001.

OLESEN, J., LEONARDI, M. The burden of brain diseases in Europe. *Eur. J. Neurol.*, 10:471-477, 2003.

O'NEILL, M.F., CONWAY, M.W. Role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. *Neuropsychopharmacology*, 24:391-398, 2001.

PAAKKARI, I., LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann. Med.*, 27:369-377, 1995.

PALMATIER, M.I., BEVINS, R.A. Chronic caffeine exposure in rats blocks a subsequent nicotine-conditioned taste avoidance in a one-bottle, but not a two-bottle test. *Pharmacol Biochem Behav.* 70:279-289, 2001.

PAN, W.J., OSMANOVIĆ, S.S., SHEFNER, S.A. Characterization of the adenosine A₁ receptor-activated potassium current in rat locus ceruleus neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273:537-544, 1995.

PAOLETTI, P., ASCHER, P., NEYTON, J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J. Neurosci.*, 17:5711-5725, 1997.

PAPP, M., MORYL, E. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol.* 263:1-7, 1994.

PARIANTE, C.M., MAKOFF, A., LOVESTONE, S., FEROLI, S., HEYDEN, A., MILLER, A.H. Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function in vitro by modulating the membrane steroid transporters. *Br. J. Pharmacol.*, 134:1335-1343, 2001.

- PARIANTE, C.M., KIM, R.B., MAKOFF, A., KERWIN, R.W. Antidepressant fluoxetine enhances glucocorticoid receptor function in vitro by modulating membrane steroid transporters. *Br. J. Pharmacol.*, 139:1111-1118, 2003.
- PARK, C., CHO, K., RYU, J.H., SHIN, K.S., KIM, J., AHN, H., HUH, Y. 7-Nitroindazole upregulates phosphorylated cAMP response element binding protein, polysialylated-neural cell adhesion molecule and tryptophan hydroxylase expression in the adult rat hippocampus. *Brain Res.*, 1008:120-125, 2004.
- PAUL, I.A., LAYER, R.T., SKOLNICK, P., NOWAK, G. Adaptation of the NMDA receptor in rat cortex following chronic electroconvulsive shock or imipramine. *Eur. J. Pharmacol.* 247:305-311, 1993.
- PECORARO, N., REYES, F., GOMEZ, F., BHARGAVA, A., DALLMAN, M.F. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*, 145:3754-3762, 2004.
- PEDRAZZA, E.L., RICO, E.P., SENGER, M.R., PEDRAZZA, L., ZIMMERMANN, F.F., SARKIS, J.J., BOGO, M.R., BONAN, C.D. Ecto-nucleotidase pathway is altered by different treatments with fluoxetine and nortriptyline. *Eur. J. Pharmacol.*, 583:18-25, 2008.
- PÊGO, J.M., MORGADO, P., PINTO, L.G., CERQUEIRA, J.J., ALMEIDA, O.F., SOUSA, N. Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. *Eur. J. Neurosci.*, 27:1503-1516, 2008.
- PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 14:149-167, 1985.
- PERKINS, M.N., STONE, T.W. Blockade of striatal neurone responses to morphine by aminophylline: evidence for adenosine mediation of opiate action. *Br. J. Pharmacol.*, 69:131-137.
- PETTENUZZO, L.F., NOSCHANG, C., VON POZZER TOIGO, E., FACHIN, A., VENDITE, D., DALMAZ, C. Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav.*, in press, 2008.
- PETRIE, R.X., REID, I.C., STEWART, C.A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. *Pharmacol. Ther.*, 87:11-25, 2000.
- PHILLIS, J.W., WU, P.H. The effect of various centrally active drugs on adenosine uptake by the central nervous system. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72:179-187, 1982.
- PHILLIS, J.W. Potentiation of the action of adenosine on cerebral cortical neurons by the tricyclic antidepressants. *Br. J. Pharmacol.*, 83:567-575, 1984.
- PORSOLT, R.D., BERTIN, A., JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 229: 327-336, 1977.
- PREDIGER, R.D., FERNANDES, D., TAKAHASHI, R.N. Blockade of adenosine A_{2A} receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behav. Brain Res.* 159:197-205, 2005.

PREDIGER, R.D., PAMPLONA, F.A., FERNANDES, D., TAKAHASHI, R.N. Caffeine improves spatial learning deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) - the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 8:583-594, 2005.

PREDIGER, R.D., DA SILVA, G.E., BATISTA, L.C., BITTENCOURT, A.L., TAKAHASHI, R.N. Activation of adenosine A1 receptors reduces anxiety-like behavior during acute ethanol withdrawal (hangover) in mice. *Neuropsychopharmacology* 31:2210-20, 2006.

QUINAUX, N., SCUVÉE-MOREAU, J., DRESSE, A. Inhibition of in vitro and ex vivo uptake of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine by five antidepressants; correlation with reduction of spontaneous firing rate of central monoaminergic neurones. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 319:66-70, 1982.

RALEVIC, V., BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.*, 50:413-492, 1998.

REBOLA, N., OLIVEIRA, C.R., CUNHA, R.A. Transducing system operated by adenosine A_{2A} receptors to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.*, 454:31-38, 2002.

REBOLA, N., SEBASTIÃO, A.M., DE MENDONÇA, A. Enhanced adenosine A_{2A} receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *J. Neurophysiol.*, 90:1295-1303, 2003.

REDROBE, J.P., PINOT, P., BOURIN, M. The effect of the potassium channel activator, cromakalim, on antidepressant drugs in the forced swimming test in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 10:524-528, 1996.

REDROBE, J. P., MACSWEENEY, C.P., BOURIN, M. The role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.*, 318:213-220, 1996.

REDROBE, J.P., BOURIN, M. Partial role of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.*, 325:129-135, 1997.

REYNOLDS, I.J., HASTINGS, T.G. Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J. Neurosci.*, 15:3318-27, 1995.

RIBEIRO, J.A., SEBASTIÃO, A.M., MENDONÇA, A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.*, 68:377-392, 2003.

RISCH, S.C., NEMEROFF, C.B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J. Clin. Psychiatry*, 1992.

ROCHA, M.A., PUECH, A.J., THIEBOT, M.H. Influence of anxiolytic drugs on the effects of specific serotonin reuptake inhibitors in the forced swimming test in mice. *J. Psychopharmacology*, 11:211-218, 1997.

RODRIGUES, A.L., ROSA, J.M., GADOTTI, V.M., GOULART, E.C., SANTOS, M.M., SILVA, A.V., SEHNEM, B., ROSA, L.S., GONÇALVES, R.M., CORRÊA, R., SANTOS, A.R. Antidepressant-like and antinociceptive-like actions of 4-(4'-chlorophenyl)-6-(4''-methylphenyl)-2-hydrazinepyrimidine Mannich base in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 82:156-62, 2005.

ROGERS, N., IGNARRO, L.J. (1992). Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189:242-249, 1992.

ROGÓZ, Z., SKUZA, G., MAJ, J., DANYSZ, W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology*, 42:1024-1030, 2002.

SAITOH, A., KIMURA, Y., SUZUKI, T., KAWAI, K., NAGASE, H., KAMEI, J. Potential anxiolytic and antidepressant-like activities of SNC80, a selective delta-opioid agonist, in behavioral models in rodents. *J. Pharmacol. Sci.*, 95:374-380, 2004.

SALEM, A., HOPE, W., 1997. Effect of adenosine receptor agonists and antagonists on the expression of opiate withdrawal in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 57:671-679.

SAPOLSKY, R.M. Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98:12320-12322, 2001.

SARGENT, P.A., KJAER, K.H., BENCH, C.J., RABINER, E.A., MESSA, C., MEYER, J., GUNN, R.N., GRASBY, P.M., COWEN, P.J. Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 57:174-180, 2000.

SARGES, R., HOWARD, H.R., BROWNE, R.G., LABEL, L.A., SEYMOUR, P.A., KOE, B.K. 4-Amino[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalines. A novel class of potent adenosine receptor antagonists and potential rapid-onset antidepressants. *J. Med. Chem.*, 33:2240-2254, 1990.

SASABE, J., CHIBA, T., YAMADA, M., OKAMOTO, K., NISHIMOTO, I., MATSUOKA, M., AISO, S. D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* 26:4149-4159, 2007.

SCACCIANOCE, S., NAVARRA, D., DI SCIULLO, A., ANGELUCCI, L., ENDRÖCZI, E. Adenosine and pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Neuroendocrinology*, 50:464-468, 1989.

SHIMADA, J., KOIKE, N., NONAKA, H., SHIOZAKI, S., YANAGAWA, K., KANDA, T. Adenosine A_{2A} antagonists with potent anti-cataleptic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 7:2349-2352, 1997.

SCHMUED, L.C., STOWERS, C.C., SCALLET, A.C., XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.*, 1035:24-31, 2005.

SCHMUED, L.C., ALBERTSON, C., SLIKKER, W. Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 751:37-46, 1997.

- SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*, 122:509-522, 1965.
- SCHWARZSCHILD, M.A., CHEN, J.F., ASCHERIO, A. Caffeinated clues and the promise of adenosine A_{2A} antagonists in PD. *Neurology*, 58:1154-1160, 2002.
- SCHOLZ, K.P., MILLER, R.J. Presynaptic inhibition at excitatory hippocampal synapses: development and role of presynaptic Ca²⁺ channels. *J. Neurophysiol.*, 76:39-46, 1996.
- SCHUMAN, E.M., MADISON, D.V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, 254:1503-1506, 1991.
- SCHECHTER, L.E. The potassium channel blockers 4-aminopyridine and tetraethylammonium increase the spontaneous basal release of [3H]5-hydroxytryptamine in rat hippocampal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282:262-270, 1997.
- SHELIN, Y.I. Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol. Psychiatry*, 1:298-299, 1996.
- SHIRAYAMA, Y., ISHIDA, H., IWATA, M., HAZAMA, G.I., KAWAHARA, R., DUMAN, R.S. Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. *J. Neurochem.*, 90:1258-1268, 2004.
- SIMOLA, N., MORELLI, M., PINNA, A. Adenosine A_{2A} receptor antagonists and Parkinson's disease: state of the art and future directions. *Curr. Pharm. Des.*, 14:1475-1489, 2008.
- SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. *Eur. J. Pharmacol.* 375:31-40, 1999.
- SKOLNICK, P., LAYER, R.T., POPIK, P., NOWAK, G., PAUL, I.A., TRULLAS, R. Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry*, 29:23-26, 1996.
- SNYDER, S.H. *Drugs and the brain*. New York: W.H. Freeman, 1996.
- SOUSA, N., ALMEIDA, O. F. X., HOLSBOER, F., PAULA-BARBOSA, M. M., MADEIRA, M. D. Maintenance of hippocampal cell numbers in young and aged rats submitted to chronic unpredictable stress. Comparison with the effects of corticosterone treatment. *Stress*, 1:237-250, 1998.
- SOUSA, N., MADEIRA, M. D., PAULA-BARBOSA, M. M. Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study. *Brain Res.* 794:199-210, 1998.
- SOUSA, N., LUKOYANOV, N.V., MADEIRA, M.D., ALMEIDA, O.F., PAULA-BARBOSA, M.M. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*, 97:253-266, 2000.
- SPERLÁGH, B., ZSILLA, G., VIZI, E.S. K_{ATP} channel blockers selectively interact with A₁-adenosine receptor mediated modulation of acetylcholine release in the rat hippocampus. *Brain Res.* 889:63-70, 2001.

- SPROUSE, J.S., AGHAJANIAN, G.K. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse.*, 1:3-9, 1987.
- STEIN, D.J. Comorbidity in generalized anxiety disorder: impact and implications. *J. Clin. Psychiatry*, 62:29–36, 2001.
- STAMLER, J.S., SINGEL, D.J., LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.*, 258:1898-1902, 1992.
- STOLL, A.L., RUETER, S. Treatment augmentation with opiates in severe and refractory major depression. *Am. J. Psychiatry*, 156:2017, 1999.
- SUZUKI, E., YAGI, G., NAKAKI, T., KANBA, S., ASAI, M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J. Affect. Disord.*, 63:221-224, 2001.
- SVENNINGSSON, P., NOMIKOS, G.G., FREDHOLM, B.B. Biphasic changes in locomotor behavior and in expression of mRNA for NGFI-A and NGFI-B in rat striatum following acute caffeine administration. *J. Neurosci.*, 15:7612–7624, 1995.
- SVENNINGSSON, P., LE MOINE, C., FISONE, G., FREDHOLM, B.B. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A_{2A} receptors. *Prog. Neurobiol.*, 59:355-396, 1999.
- SWAAB, D.F., BAO, A., LUCASSEN, P.J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res. Ver.*, 4:141-194, 2005.
- SYKOVÁ, E. Glia and volume transmission during physiological and pathological states. *J. Neural. Transm.*, 112:137-147, 2005.
- SZABO, S. The creative and productive life of Hans Selye: a review of his major scientific discoveries. *Experientia*, 41:564–567, 1985.
- SZASZ, B.K., MIKE, A., KAROLY, R., GEREVICH, Z., ILLES, P., VIZI, E.S., KISS, J.P. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biol. Psychiatry*, 62:1303-1309, 2007.
- TAGLIAFERRO, P., RAMOS, A.J., LOPEZ-COSTA, J.J., LÓPEZ, E.M., BRUSCO, A. Changes in the postnatal development on nitric oxide system induced by serotonin depletion. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 146:39-49, 2003.
- TAKAHASHI, R.N., PAMPLONA, F.A., PREDIGER, R.D. Adenosine receptor antagonists for cognitive dysfunction: a review of animal studies. *Front. Biosci.*, 13:2614-32, 2008.
- TANAKA, H., NAKAZAWA, K., ARIMA, M., IWASAKI, S. Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat. *Brain Dev.*, 6:355-361, 1984.
- TANAKA, J., FUJITA, H., MATSUDA, S., TOKU, K., SAKANAKA, M., MAEDA, N. Glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors in microglial cells: the two receptors mediate differential effects of corticosteroids. *Glia*, 20:23-37, 1997.

TEJEDOR-REAL, P., MICÓ, J.A., SMADJA, C., MALDONADO, R., ROQUES, B.P., GILBERT-RAHOLA, J. Involvement of delta-opioid receptors in the effects induced by endogenous enkephalins on learned helplessness model. *Eur. J. Pharmacol.*, 354:1-7, 1998.

TORRES, S.J., NOWSON, C.A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23: 887-894, 2007.

TETZLAFF, W., SCHUBERT, P., KREUTZBERG, G.W. Synaptic and extrasynaptic localization of adenosine binding sites in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 21: 869-875, 1987.

THOME, J., PESOLD, B., BAADER, M., HU, M., GEWIRTZ, J.C., DUMAN, R.S., HENN, F.A. Stress differentially regulates synaptophysin and synaptotagmin expression in hippocampus. *Biol. Psychiatry*, 50:809-812, 2001.

TYTGAT, J., MAERTENS, C., DAENENS, P. Effect of fluoxetine on a neuronal, voltage-dependent potassium channel (Kv1.1). *Br. J. Pharmacol.*, 122:1417-1424, 1997.

WAKSMAN, G., HAMEL, E., FOURNIÉ-ZALUSKI, M.C., ROQUES, B.P. Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase "enkephalinase" and of mu and delta opioid receptors in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:1523-1527, 1986.

WEBB, R.L., MCNEAL, R.B. JR., BARCLAY, B.W., YASAY, G.D. Hemodynamic effects of adenosine agonists in the conscious spontaneously hypertensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254:1090-1099, 1990.

WEGENER, G., VOLKE, V., HARVEY, B.H., ROSENBERG, R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Res.*, 959:128-134, 2003.

VOLLMAYR, B., HENN, F.A. Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. *Brain Res. Protoc.*, 8:1-7, 2001.

VYAS, A., CHATTARJI, S. *Behav. Neurosci.*, 118:1450-1454, 2004.

VYAS, A., PILLAI, A. G., CHATTARJI, S. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 128:667-673, 2004.

WANG, S.J. Caffeine facilitation of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes) through activation protein kinase C pathway: an interaction with presynaptic adenosine A₁ receptors. *Synapse*, 61:401-411, 2007.

WICKENDEN, A., 2002. K⁺ channels as therapeutic drug targets, *Pharmacol. Ther.*, 94:157-182.

WILLIAMS, M. Adenosine antagonists. *Med. Res. Rev.*, 9:219-243, 1989.

WILEY, J.L., CRISTELLO, A.F., BALSTER, R.L. Effects of site-selective NMDA receptor antagonists in an elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 294:101-107, 1995.

- WILLNER, P., TOWEL, A., SAMPSON, D., SOPHOKLEOUS, S., MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93:358–364, 1987.
- WILLNER, P., MUSCAT, R., PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 16:525–534, 1992.
- WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134:319–329, 1997.
- WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52:90-110, 2005.
- WITTCHEN, H.U., KNÄUPER, B., KESSLER, R.C. Lifetime risk of depression. *Br. J. Psychiatry. Suppl.*, 26:16-22, 1994.
- WOOLLEY, C. S., GOULD, E., MCEWEN, B. S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult pyramidal neurons. *Brain Res.*, 531: 225–231, 1990.
- WOLOSKER, H., DUMIN, E., BALAN, L., FOLTYN, V.N. D-Amino acids in the brain: d-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *FEBS J.* 275:3514-3526, 2008.
- WONG, M.L., LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2:343–351, 2001.
- WONG, D.T., PERRY, K.W., BYMASTER, F.P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 4:764-774, 2005.
- WRIGHT, R.L., CONRAD, C.D. Chronic stress leaves novelty-seeking behavior intact while impairing spatial recognition memory in the Labirinto em Y. *Stress*, 8:151-154, 2005.
- WRIGHT, R.L., CONRAD, C.D. Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits. *Behav. Brain Res.*, 187:41-47, 2008.
- WU, S., BASILE, A.S., BARGER, S.W. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by secreted amyloid precursor protein (sAPP). *Curr. Alzheimer Res.*, 4:243-251, 2007.
- VALTORTA, F., PENNUTO, M., BONANOMI, D., BENFENATI, F. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26:445-453, 2004.
- VAN CALKER, D., BIBER, K. The role of glial adenosine receptors in neural resilience and the neurobiology of mood disorders. *Neurochem. Res.*, 30:1205-1217, 2005.
- VARONA. A., GIL, J., SARACIBAR, G., MAZA, J.L., ECHEVARRIA, E., IRAZUSTA, J. Effects of imipramine treatment on delta-opioid receptors of the rat brain cortex and striatum. *Arzneimittelforschung*, 53:21-25, 2003.
- VOLLMANN-HONSDORF, G.K., FLUGGE, G., FUCHS, E. Chronic psychosocial stress does not affect the number of pyramidal neurons in tree shrew hippocampus. *Neurosci. Lett.*, 233:121–124, 1997.

VOLKE, V., WEGENER, G., BOURIN, M., VASAR, E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. *Behav. Brain Res.*, 140:141-147, 2003.

VON LUBITZ, D.K., LIN, R.C., POPIK, P., CARTER, M.F., JACOBSON, K.A. Adenosine A₃ receptor stimulation and cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.*, 263:59-67, 1994

VON LUBITZ, D.K., LIN, R.C., JACOBSON, K.A. Cerebral ischemia in gerbils: effects of acute and chronic treatment with adenosine A_{2A} receptor agonist and antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 287:295-302, 1995.

YEUNG, S.Y., MILLAR, J.A., MATHIE, A. Inhibition of neuronal KV potassium currents by the antidepressant drug fluoxetine. *Br. J. Pharmacol.*, 128:1609-1615, 1999.

YILDIZ, F., ERDEN, B.F., ULAK, G., UTKAN, T., GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7- nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*, 149:41-44, 2000.

ZIMMERMANN, H., BRAUN, N. Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog. Brain Res.*, 120:371-385, 1999.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 362:299-309, 2000.

ZHOU, L., WELSH, A.M., CHEN, D., KOLIATSOS, V.E. NMDA inhibitors cause apoptosis of pyramidal neurons in mature piriform cortex: evidence for a nitric oxide-mediated effect involving inhibitory interneurons. *Neuropharmacology*, 52:1528-1537, 2007.