UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Participação da via NMDA-NO do córtex pré-frontal medial ventral na
modulação das consequências comportamentais do estresse de nado
forçado: mecanismos intracelulares.**

VITOR SILVA PEREIRA

Ribeirão Preto

2015

VITOR SILVA PEREIRA

Participação da via NMDA-NO do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado: mecanismos intracelulares.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Ribeirão Preto

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pereira, Vitor Silva

Participação da via NMDA-NO do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado: mecanismos intracelulares. Ribeirão Preto, 2014.

191 p.: il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração: Farmacologia), - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2015.

Orientador: Joca, Sâmia Regiane Lourenço.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Silva Pereira

Participação da via NMDA-NO do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado: mecanismos intracelulares.

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Farmacologia.

Aprovado em: _____/_____/2015.

Banca examinadora

Prof(a). Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____.

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr.

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____.

Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco

Instituição: FMRP – USP

Assinatura:_____.

Prof(a). Dra. Vanessa Beijamini

Instituição: UFES

Assinatura:_____.

Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

Instituição: FFCLRP – USP

Assinatura:_____.

A minha mãe, Yvanéa.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dr^a. Sâmia Regiane Lourenço Joca, por todo apoio e confiança em mim depositados e, principalmente, pela excelente orientação.

Ao professor Dr. Francisco Silva Guimarães, pelas discussões em seminários e pelo espaço cedido em seu laboratório.

Ao professor Dr. Leonardo Resstel, pelo apoio, discussões e conselhos sobre o projeto, sem esquecer os churrascos muito bem preparados por ele.

Ao professor Dr. Gregers Wegener, da Universidade de Aarhus – Dinamarca, por ter me aceitado para realização de estágio no exterior em seu laboratório e por todo aprendizado obtido nessa excelente oportunidade.

Ao Vinicius Sato, grande amigo do laboratório e de todo meu tempo em Ribeirão Preto, pela ajuda, pelas conversas e discussões.

Aos amigos e amigas do laboratório, Laura A. S., Laura L., Cassiano, Karina, Ariandra, Deidiane, Murilo, Rafaela, Izaque e Aline pela ótima convivência.

À nossa técnica do laboratório Flávia Sallata, pela ajuda no dia a dia do laboratório. Aos técnicos José Carlos e Eleni, do laboratório do professor Francisco S. Guimarães, por toda a ajuda.

As secretárias Sonia, Fátima, Marlene e ao José Waldik Ramon por todos os esclarecimentos, ajuda com documentação e também pelos conselhos. A dona Nina por toda a ajuda no laboratório.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela estrutura e condições oferecidas para o desenvolvimento do projeto como um todo.

Aos fundos de fomento à pesquisa, FAPESP, CNPQ e FAEPA, pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos e amigas Laena e Janyerson, obrigado pela ótima convivência, amizade e paciência comigo.

Aos amigos e amigas de Santa Catarina com quem cresci ou que fiz durante a faculdade, que mesmo distantes sempre me apoiaram e até hoje continuam presentes.

A minha família por todo o apoio, torcida, amor e por sempre me darem forças para conquistar meus objetivos.

A minha namorada Fernanda Rodella por todo o amor, carinho, apoio e paciência em todos os momentos, principalmente naqueles em que eu achava que nada daria certo.

Finalmente agradeço a minha mãe, Yvanéa Zanelatto Silva, minha base e exemplo de esforço e dedicação, que nunca mediu esforços pela minha felicidade e cujo amor e ensinamentos foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Mãe, eternamente obrigado!

“No que diz respeito ao
empenho, ao compromisso, ao
esforço, à dedicação, não
existe meio termo. Ou você faz
uma coisa bem feita ou não
faz.”

Ayrton Senna

RESUMO

PEREIRA, V.S. **Participação da via NMDA-NO do córtex pré-frontal medial ventral na modulação das consequências comportamentais do estresse de nado forçado: mecanismos intracelulares.** 2015. 191p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA é capaz de desencadear a síntese de óxido nítrico (NO) no SNC. A administração de antagonistas NMDA (p.ex., ketamina) ou de inibidores da síntese de NO (p.ex., 7-NI) produz efeitos do tipo antidepressivo em animais e reforça o potencial dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico como alvos terapêuticos para o tratamento da depressão. Trabalhos recentes sugerem o envolvimento de vias intracelulares no controle de mecanismos de plasticidade neural, como a via BDNF-TrkB-mTOR, nos efeitos antidepressivos produzidos por antagonistas NMDA. Foi demonstrado, por exemplo, que os efeitos antidepressivos da ketamina dependem da síntese de BDNF e da ativação da mTOR no córtex pré-frontal medial (CPFMv) de ratos. O bloqueio farmacológico do CPFMv ou a administração de antagonista NMDA (LY235959) nessa estrutura também produz efeitos do tipo antidepressivo em animais. Porém, não se sabe se esses efeitos envolvem a via NMDA-NO do CPFMv, assim como não se sabe se o efeito antidepressivo induzido por inibidores da síntese de NO dependeria da via BDNF-TrkB-mTOR do CPFMv. Dessa forma, avaliamos a participação da neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica, bem como a participação da via BDNF-TrkB-mTOR, no CPFMv-pré límbico (PL), na modulação de respostas comportamentais de animais submetidos ao teste do nado forçado (TNF), um teste preditivo de efeito antidepressivo. Em um primeiro grupo de experimentos observou-se que a administração de inibidor da nNOS (NPA), da sGC (ODQ) ou de sequestrador de NO (c-PTIO) no PL de animais submetidos ao TNF promoveu efeito do tipo-antidepressivo, de forma similar ao que foi previamente descrito com a injeção local de LY235959. Posteriormente, os efeitos do LY235959, mas não os do NPA, foram bloqueados pelo tratamento prévio com antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (NBQX), sugerindo que as vias NMDA

e NO do PL estejam dissociadas na modulação das alterações comportamentais promovidas pelo TNF. A administração de BDNF no PL promoveu efeito tipo-antidepressivo, o qual foi bloqueado pelo pré-tratamento com antagonista dos receptores TrkB (K252a) ou com inibidor da mTOR (rapamicina). Os efeitos tipo-antidepressivo da administração de LY235959 ou NPA, no PL, não foram alterados na presença de K252a. No entanto, a administração prévia de rapamicina foi capaz de bloquear os efeitos do LY235959, mas não os do NPA, novamente sugerindo mecanismos distintos desencadeados por NMDA e NO no PL. Nossos dados indicam uma interação maior dos efeitos dos antagonistas NMDA com a via BDNF-TrkB-mTOR, enquanto os efeitos dos inibidores da via do NO parecem não modular essa via no PL.

O tratamento sistêmico com ketamina (antagonista NMDA) ou 7-NI (inibidor preferencial da nNOS) foi capaz de produzir efeitos do tipo antidepressivo, sendo que esses tratamentos não alteraram a ativação ou expressão dos receptores TrkB e da mTOR, no CPFm de animais estressados ou não estressados. Assim, mais estudos são necessários para esclarecer a interação das neurotransmissões glutamatérgica e nitrérgica com a via BDNF-TrkB-mTOR, no CPFm-PL, no que diz respeito ao efeito antidepressivo em animais estressados, após administração sistêmica.

Em conjunto, os dados do presente trabalho suportam o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica e nitrérgica do PL na neurobiologia das respostas comportamentais associadas a neurobiologia da depressão. Porém, a interação entre esses sistemas no PL e os mecanismos envolvidos se mostram consideravelmente complexos.

Palavras chave: Comportamento, Depressão, Glutamato, Óxido nítrico, BDNF, TrkB, mTOR, Córtex pré-frontal medial ventral, Nado forçado.

ABSTRACT

PEREIRA, V.S. **Participation of NMDA-NO pathway from the medial pré-frontal córtex on the behavioural consequences of forced swim stress: molecular mechanisms.** 2015. 191p. Thesis (Doctoral) – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The activation of NMDA receptors is capable of increasing nitric oxide (NO) synthesis in the brain. The administration of NMDA antagonists (e.g., ketamine) or nitric oxide synthesis inhibitors (e.g., 7-NI) produce antidepressant-like effects in animals and highlights the potential of glutamatergic and nitrgic systems as therapeutic targets for the treatment of major depression. The involvement of intracellular mechanisms associated to neural plasticity, such as BDNF-TrkB-mTOR pathway, has been implicated in the antidepressant-like effects induced by systemic administration of NMDA antagonists. For instance, the antidepressant effects of ketamine are associated with increased BDNF synthesis and mTOR in the medial prefrontal cortex (vMPFC). In addition, injection of an NMDA antagonist (LY235959) into the vMPFC-PL produces antidepressant-like effect in animals. However, it is not yet known if the aforementioned antidepressant-like effects involve the modulation of NO synthesis or the activation of the BDNF-TrkB-mTOR pathway in the vMPFC. Therefore, this work investigated the involvement of glutamatergic and nitrgic neurotransmission of the vMPFC, as well as the participation of local BDNF-TrkB-mTOR pathway, in the modulation of behavioral responses of animals submitted to forced swimming test, an animal model predictive of antidepressant effects. The administration of nNOS inhibitor (NPA), sGC inhibitor (ODQ) or NO scavenger (c-PTIO) into the vMPFC-PL produced antidepressant-like effects, similarly to what has been previously described with the local injection of LY235959. The effects of LY235959 were blocked by pretreatment with an antagonist of AMPA receptors (NBQX), but not the NPA effects. Thus suggesting a possible dissociation between NMDA- and NO-induced mechanism in the PL. BDNF administration in the PL induced antidepressant-like effect, which was blocked by prior administration of the TrkB receptor antagonist (K252a) or the mTOR inhibitor (rapamycin). The antidepressant-like effects induced by intra-PL administration of LY235959 and NPA, into vMPFC-PL were not altered in the

presence of K252a. However, the prior administration of rapamycin was able to block the effects of LY235959, but not NPA-induced effect. This result further supports the dissociation of the NMDA-NO system in the PL in the modulation of immobility in the FST.

Systemic treatment with ketamine (NMDA antagonist) or 7-NI (nNOS inhibitor) produced antidepressant-like effects in the FST, although these treatments did not affect the activation or the expression of TrkB receptors or mTOR in the MPFC of stressed animals. These results further corroborate the involvement of the glutamatergic and nitrgic neurotransmission in the modulation of behavioral consequences of the forced swim stress and highlight that the interaction of these systems with mTOR and trkB in the PL is considerably complex.

Altogether, our data supports the possible modulation of BDNF-TrkB-mTOR pathway of the PL in the effects induced by NMDA antagonist injection.. However, the effects induced by inhibitors of the NO pathway seems dissociated from an interaction with the aforementioned pathway. Thus, further studies are necessary to clarify the interaction of glutamatergic and nitrgic neurotransmission with BDNF-TrkB-mTOR pathway into vMPFC-PL regarding the neurobiology of stress and depression.

Key words: Behavior, Depression, Glutamate, Nitric oxide, BDNF, TrkB, mTOR Ventral Medial Prefrontal Crtex, Forced Swim.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT –	Serotonina / 5-hidroxitriptamina
5-HT_{2c} –	Receptor de 5-HT do tipo 2c
ACTH –	Hormônio adrenocorticotropina
AMPA –	Ácido α -amino-3-hidroxy-5-metil-isoxazol-4-propionico
ACC –	Córtex cingulado anterior
BDNF –	Fator de crescimento derivado do cérebro
cGMP –	Monofosfato de guanosina cíclico
CID-10 –	10ª revisão da classificação internacional de doenças e problemas de saúde relacionados
CNS –	Central nervous system
CoCl₂ –	Cloreto de cobalto
CPFM –	Córtex pré-frontal medial
CPFMv –	Córtex pré-frontal medial ventral
CRF –	Corticotrofina
CRFR1 –	Receptor 1 de CRF
DAG –	Diacylglicerol
DAP –	Desamparo aprendido
DSM-V –	Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais - Quinta Edição
ECV –	Estresse crônico variado
eNOS –	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM –	Erro padrão da média
ERK –	Quinase regulada por sinal extracelular
FCFRP-USP –	Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo
FMRP-USP –	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
FFCLRP-USP –	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

GC –	Glicocorticóides
GR –	Receptores glicocorticóides
HPA –	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HSN –	Hipofagia suprimida por novidade
IL-1β –	Interleucina 1 beta
IL –	Infra-límbico/infra-limbic
iNOS –	Óxido nítrico sintase induzida
ISRS –	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
ISRSN –	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina
L-VDCC –	Canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L
L-NNA –	L-n-nitroarginina
LTP –	Potenciação de longo prazo
LY –	LY235959
mGLUR –	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
mtNOS –	Óxido nítrico sintase mitocondrial
mTOR –	Alvo mecânico da rapamicina
mTORC1–	Complexo 1 da mTOR
mTORC2–	Complexo 2 da mTOR
NMDA –	N-metil-D-aspartato
NMDAR –	Receptores NMDA
MEK –	Proteína-quinase regulada por mitogene
NF-κB –	Fator nuclear kappa B
NMDAR –	Receptor NMDA
nNOS –	Óxido nítrico sintase neuronal
NO –	Óxido nítrico
NOS –	Óxido nítrico sintase
p-mTOR –	mTOR fosforilada
p-TrkB –	TrkB fosforilado

PI3K –	Fosfoinositol 3-quinase
PL –	Pré-límbico/pre-limbic
sGC –	Guanilato ciclase solúvel
SNC –	Sistema nervoso central
TNF –	Teste do nado forçado
TNF-α –	Fator de necrose tumoral alpha
Trk –	Tirosina quinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da localização dos sítios de administração dos animais submetidos aos experimentos com injeção de drogas no CPFMV-PL Fotomicrografia representativa do sítio de administração de drogas no CPFMV-PL.....	66
Figura 2. Efeito da administração de inibidor da óxido nítrico sintase, inibidor da guanilato ciclase solúvel e de sequestrador extracelular de óxido nítrico, intra PL, 5 minutos antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado.....	68
Figura 3. Efeito da administração de inibidor da óxido nítrico sintase, inibidor da guanilato ciclase solúvel e sequestrador extracelular de óxido nítrico, intra PL, imediatamente após o pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado.	69
Figura 4. Efeito da administração de inibidor da óxido nítrico sintase, inibidor da guanilato ciclase solúvel e sequestrador extracelular de óxido nítrico, intra PL, 5 minutos antes do teste, sobre a número de cruzamentos totais de ratos expostos ao campo aberto.	71
Figura 5. Efeito da administração de antagonista dos receptores NMDA ou da administração de inibidor da óxido nítrico sintase, intra-PL, em animais pré-tratados com antagonista de receptores AMPA (NBQX)	73
Figura 6. Efeito da administração de BDNF, isoladamente, ou em associação com com antagonista dos receptores Trk ou inibidor da mTOR em animais submetidos ao TNF.....	75
Figura 7. Efeito da administração de antagonista dos receptores NMDA em animais pré-tratados com antagonista dos receptores Trk no PL	77
Figura 8. Efeito da administração de inibidor da nNOS em animais pré-tratados com antagonistas dos receptores Trk no PL.....	78
Figura 9. Efeito da administração de antagonista dos receptores NMDA em animais pré-tratados com inibidor da mTOR no PL.....	79

Figura 10. Efeito do inibidor da óxido nítrico sintase neuronal em animais pré-tratados com inibidor da mTOR no PL.....	80
Figura 11. Efeito da administração sistêmica aguda de antagonista do receptores de glutamato do tipo NMDA, imipramina ou veículo, uma hora antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado.....	83
Figura 12. Efeito da administração sistêmica aguda de inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME), imipramina ou veículo, uma hora antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado.	84
Figura 13. Efeito da administração sistêmica repetida de inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (diluído com polietilenoglicol 400 a 50%), imipramina ou veículo, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado.....	85
Figura 14. Efeito da administração sistêmica aguda de inibidor da óxido nítrico sintase neuronal, imipramina ou veículo, uma hora antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado.....	86
Figura 15. Efeito da administração de antagonista NMDA, inibidor seletivo da nNOS, inibidor da NOS ou veículo, via i.p., uma hora antes do teste, sobre o número de cruzamentos totais de ratos expostos ao campo aberto.....	88
Figura 16. Efeito da administração sistêmica aguda de antagonista NMDA pré-tratados com inibidor da mTOR ou de antagonista dos receptores Trk intra CPMv-PL.....	90
Figura 17. Efeito da administração sistêmica aguda de inibidor da nNOS pré-tratados com inibidor da mTOR ou de antagonista dos receptores Trk intra CPMv-PL.....	91
Figura 18. Efeito da administração de antagonista NMDA, inibidor seletivo da nNOS e inibidor da NOS, via i.p., sobre a expressão de TrkB total e fosforilado no CFM de animais submetidos ao TNF.....	93
Figura 19. Efeito da administração de antagonista NMDA, inibidor seletivo da nNOS e inibidor da NOS, via i.p., sobre a expressão de mTOR total e fosforilado no CFM de animais submetidos ao TNF.....	94

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1. Depressão.....	20
1.1.1. Modelos animais de depressão.....	25
1.2. Córtex pré-frontal e depressão.....	28
1.3. Glutamato e depressão.....	30
1.4. Óxido nítrico e Depressão.....	37
1.5. BDNF e Depressão.....	41
1.5.1. Antagonistas do receptor TrkB e inibidores da mTOR.....	47
2. Hipótese.....	50
3. Objetivos.....	51
3.1. Objetivo geral.....	51
3.2. Objetivos específicos.....	51
4. Materiais e métodos.....	53
4.1. Animais.....	53
4.2. Drogas.....	53
4.3. Protocolos experimentais.....	54
4.3.1. Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas.....	54
4.3.2. Análise histológica dos sítios de administração de drogas.....	55
4.3.3. Teste do nado forçado.....	55
4.3.4. Teste do Campo Aberto.....	56
4.3.5. Extração de proteínas.....	56
4.3.6. Análise da expressão de trkB e mTOR por Western Blotting.....	57
4.4. Desenho Experimental.....	58
4.4.1. Experimentos com injeção central de drogas.....	58
4.4.2. Experimentos com injeção sistêmica de drogas.....	61
4.4.3. Experimentos com análise da expressão TrkB e mTOR.....	63
4.5. Análise estatística.....	63
5. Resultados.....	65
6. Discussão.....	95

7. Conclusões.....	118
---------------------------	------------

Referências bibliográficas.....	120
--	------------

ANEXO 1

ANEXO 2

ANEXO 3

1. Introdução

1.1 Depressão

Menções aos transtornos comportamentais, nos quais se inclui a depressão maior, são descritos por diferentes povos desde a antiguidade e os primeiros registros datam do século 2 d.C. (Sartorius, 2001). No entanto, a primeira classificação contendo uma descrição mais clara foi elaborada no final do século 19, produzida pelo psiquiatra alemão Emil Kraepelin, onde ele separava a depressão e mania de distúrbios como a esquizofrenia (Angst *et al.*, 2008). Posteriormente, com a evolução da medicina e caracterização dos distúrbios do humor, foram desenvolvidos manuais de diagnóstico específicos como, por exemplo, o DSM (Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais – atualmente em sua Quinta Edição) e o CID-10 (10ª revisão da Classificação Internacional de Doenças e problemas de saúde relacionados), sendo esses dois os mais utilizados atualmente.

Segundo o DSM–V, o indivíduo deprimido deve apresentar pelo menos quatro sintomas, por um período de duas semanas consecutivas ou mais, tais como: anedonia, alterações no apetite, no peso e na atividade psicomotora, sentimentos de culpa, dificuldade de pensar ou concentrar-se e pensamentos de morte recorrentes (American Psychiatric Association, 2013).

Atualmente, dados da Organização Mundial de Saúde indicam que a depressão maior é a terceira maior causa de debilitação e perda de produtividade no mundo, sendo previsto que até 2030 ela seja a principal. Além disso, esse transtorno está associado à morbidade severa e a um risco aumentado de mortalidade (Organização Mundial de Saúde, 2008). Dessa forma, o transtorno depressivo representa um sério problema de saúde pública para a sociedade.

Embora descrita há séculos, a depressão passou a ser melhor compreendida apenas após a década de 1960 quando foi proposta a “teoria monoaminérgica clássica da depressão”. Essa teoria foi estabelecida após duas importantes revisões (Schildkraut, 1965; Coppen, 1967) que sumarizavam as análises e discussões de diferentes pesquisadores que observavam em seus estudos que os antidepressivos disponíveis na época atuavam modulando positivamente o sistema monaminérgico, com destaque para a noradrenalina e serotonina (Schildkraut, 1965; Coppen, 1967; Mulinari, 2012). Assim, foi possível propor que a depressão maior se desenvolveria devido a uma deficiência na transmissão monoaminérgica no sistema nervoso central (SNC) (Hindmarch, 2002; Malberg *et al.*, 2005; Mulinari, 2012). Desse modo, foi possível buscar o desenvolvimento de drogas direcionadas a facilitação das neurotransmissões monoaminérgicas para o tratamento da depressão.

Os primeiros antidepressivos utilizados foram os inibidores da monoamina oxidase, enzima que degrada as monoaminas, e os antidepressivos tricíclicos, drogas que inibem a recaptação de monoaminas (noradrenalina, serotonina - 5-HT – e/ou dopamina) de forma não seletiva, os quais devido à falta de seletividade causam diversos efeitos colaterais (Millan, 2006). Com o aumento da busca por novas drogas antidepressivas, desenvolveram-se drogas mais seletivas, como os inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS), inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (ISRN) e os inibidores seletivos da recaptação 5-HT e noradrenalina (ISRSN, antidepressivos mistos), tendo esses tratamentos menos efeitos colaterais e, portanto, melhoram a adesão dos pacientes ao tratamento (Millan, 2006). Até hoje, em geral, o uso de ISRSN ou de ISRS constitui o tratamento farmacológico de primeira escolha para a depressão, embora o uso dessas medicações ainda não produza resultados clínicos totalmente satisfatórios (Hindmarch, 2002; Morilak *et al.*, 2004).

Devido ao fato de que as drogas antidepressivas disponíveis apresentam uma latência média de duas a quatro semanas para os primeiros efeitos terapêuticos e que aproximadamente 40% dos pacientes não responde a essas drogas, a teoria monoaminérgica da depressão é considerada reducionista (Hindmarch, 2002; Morilak *et al.*, 2004). Assim, estudos recentes buscando compreender melhor o transtorno depressivo vem demonstrando que sua neurobiologia é complexa, indicando a participação de outros sistemas de neurotransmissão, tais como os sistemas glutamatérgico e nitrérgico, bem como o envolvimento de neurotrofinas (Skolnick *et al.*, 2003; Gregers Wegener, 2010; Duman *et al.*, 2012; Machado-Vieira *et al.*, 2012)

Teorias mais recentes vêm avaliando e incluindo fatores como a pré-disposição genética, ocorrência de eventos estressantes e prejuízos plásticos no SNC como eventos intensamente relacionados ao desenvolvimento da depressão maior (Manji *et al.*, 2001; Wurtman, 2005; Price *et al.*, 2009). Nesse sentido, muitos trabalhos que avaliam a relação entre o estresse e a depressão demonstram de forma consistente que a intensidade do fator estressante e como o indivíduo responde a esse evento podem estar diretamente ligados a ocorrência de episódios depressivos (Amat *et al.*, 2005; Czeh *et al.*, 2008; Calabrese *et al.*, 2009).

Considerando as respostas adaptativas ao estresse, o principal mecanismo de adaptação envolve a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o controle deste sobre a produção de glicocorticoides (GC) (Nestler *et al.*, 2002a; Bale, 2006; Calabrese *et al.*, 2009). Resumidamente, o eixo HPA funciona da seguinte forma: ativação dos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo promove a secreção do fator de liberação de corticotrofina (CRF), que por sua vez age sobre a glândula pituitária estimulando a secreção do hormônio adrenocorticotropina (ACTH) e este por fim estimula a síntese e liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos,

corticosterona em roedores). Os glicocorticoides, através dos receptores glicocorticoides (GR), podem controlar uma série de respostas metabólicas e comportamentais (Nestler *et al.*, 2002a; Czeh *et al.*, 2008). O controle do eixo HPA se dá principalmente através de três regiões do sistema nervoso central, sendo elas o córtex pré-frontal, o hipocampo e amígdala (Nestler *et al.*, 2002a; Czeh *et al.*, 2008). O mecanismo de *feedback negativo* é principal ferramenta auto-regulatória pela qual o eixo HPA controla sua atividade, onde quantidades elevadas de glicocorticoides ativam os GR presentes no córtex pré-frontal e hipocampo, de forma a sinalizar a necessidade de inibição do eixo (Nestler *et al.*, 2002a; Czeh *et al.*, 2008; Calabrese *et al.*, 2009). Porém, eventos estressantes de alta intensidade que ocorram de forma aguda ou crônica podem resultar em prejuízo desse mecanismo, assim levando a uma ativação exacerbada do eixo HPA e hipercortisolemia, o que causar neurotoxicidade (Bale, 2006; Calabrese *et al.*, 2009).

A hipercortisolemia causada pelo estresse é capaz de promover prejuízos plásticos e estruturais no SNC através de uma considerável diversidade de mecanismos, destacando-se os seguintes: (1) aumento da produção de fatores inflamatórios como NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , aumento da expressão forma induzida de enzima óxido nítrico sintase (iNOS); (2) redução da neurogênese no hipocampo; (3) aumento da concentração de glutamato na fenda sináptica por reduzir a captação e estimular a liberação desse neurotransmissor; (4) aumento das concentrações intracelulares de cálcio por reduzir a expressão da bomba cálcio-ATPase (Lee *et al.*, 2002; Sapolsky, 2004; Sorrells *et al.*, 2009; Treccani *et al.*, 2014). Essas alterações são vistas em sua maioria em regiões do SNC como o hipocampo e córtex pré-frontal, que além de participar do controle do eixo HPA também são importantes no controle de respostas comportamentais. Assim, danos funcionais nesses locais resultam em

respostas comportamentais e emocionais inadequadas, predispondo ao desenvolvimento de transtornos depressivos (Rocher *et al.*, 2004; Czeh *et al.*, 2008; Sorrells *et al.*, 2009). Confirmando tais evidências, esses prejuízos comportamentais não ocorrem em animais adrenalectomizados e posteriormente estressados (McEwen *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 1998; Brinks *et al.*, 2007), corroborando a hipótese de que as alterações plásticas e os prejuízos comportamentais devidos a exposição ao estresse crônico seriam mediadas pelo aumento de GC. Além disso, diversos estudos demonstram que a exposição de animais a modelos de estresse como, por exemplo, o estresse social crônico (Rygula *et al.*, 2006), o estresse por restrição (Brown *et al.*, 2005), e o nado forçado (Izquierdo *et al.* 2006), é capaz de inibir a proliferação celular no hipocampo e induzir a retração de dendritos no córtex pré-frontal (Brown *et al.*, 2005; Izquierdo *et al.*, 2006; Czeh *et al.*, 2007), desse modo gerando déficits comportamentais, como anedonia e diminuição da atividade exploratória (Rygula *et al.*, 2006).

Corroborando essa hipótese, grande parte dos pacientes deprimidos apresenta aumento da atividade do eixo HPA, com elevação dos níveis séricos de GC e dos níveis de mediadores da ativação do eixo HPA, como o CRF, e interessante, o tratamento com antidepressivos clássicos é capaz de atenuar essas alterações (Nestler *et al.*, 2002b; McEwen, 2004; de Kloet *et al.*, 2005; Bale, 2006).

Portanto, baseando-se nas alterações induzidas por eventos estressores, sejam elas plásticas ou comportamentais, e que as mesmas podem ser atenuadas ou revertidas pelo tratamento repetido com drogas antidepressivas, emprega-se a exposição de animais a situações estressantes, por exemplo o nado forçado, como modelo experimental para o estudo da neurobiologia da depressão e para a

identificação de novas drogas com ação antidepressiva (O'Neil *et al.*, 2003; Keith Matthews, 2005; McArthur *et al.*, 2006).

1.1.1 Modelos animais de depressão

Por definição, "...podemos dizer que qualquer sistema A é um modelo para o sistema B se o estudo de A é útil para a compreensão de B, descartando-se qualquer conexão casual direta entre A e B" (Kaplan, 1973). De uma maneira mais aplicada ao contexto de neurociência comportamental, é melhor definido que "um modelo animal com relevância biológica e/ou clínica em ciências comportamentais é um organismo vivo usado para estudar relações cérebro-comportamento sob condições controladas, com o objetivo final de ganhar introspeção em, e permitir previsões sobre, essas relações em humanos e/ou uma espécie além da estudada, ou na mesma espécie em condições diferentes daquelas em que o estudo é realizado" (van der Staay, 2006).

Portanto, nos estudos envolvendo neurociências e comportamento o uso de modelos animais permite investigar as relações entre cérebro e comportamento, principalmente com o objetivo de obter informações que podem ser transpostas para o comportamento humano, para o funcionamento neuronal e os processos neurológicos (van der Staay, 2006). Indubitavelmente, ganhos maiores seriam obtidos com estudos em humanos, mas questões éticas e de viabilidade experimental impedem a aplicação, padronização e controle de modelos humanos para tais estudos (van der Staay, 2006). Assim, o uso de modelos animais constitui uma ferramenta importante para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos para o SNC, pois permite (1) reproduzir aspectos do transtorno comportamental estudado, (2) obter informações sobre as drogas que podem tratar o transtorno em estudo e (3) identificar

novos alvos moleculares que podem ser usados para o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos (McArthur *et al.*, 2006).

Em relação a transtornos psiquiátricos como a depressão maior, a caracterização do comportamento e dos sintomas da doença vem da observação de fenótipos altamente complexos e com grande variabilidade entre indivíduos (van der Staay, 2006). Tal fato dificulta a modelagem adequada para uso de animais em estudos de comportamento. Dessa forma, o uso de traços comportamentais menores, chamados de endofenótipos, permite a estruturação de modelos animais para o estudo de doenças neuropsiquiátricas (van der Staay, 2006). Atualmente, existe uma grande variedade de modelos que foram desenvolvidos para o estudo da neurobiologia da depressão, os quais podem ser classificados em diferentes grupos, valendo destacar: (1) modelos neuroquímicos, onde são usados agentes farmacológicos para a produção de comportamentos tipo depressivos; (2) modelos etológicos, baseados em estresse social ou estresse ambiental; e (3) modelos genéticos, onde são utilizados animais de linhagem geneticamente selecionadas ou animais com alterações genéticas induzidas (p.ex. por deleção de genes) (McArthur *et al.*, 2006).

Dentre todos os modelos existentes, os modelos etológicos com exposição a estresse ambiental estão entre os mais utilizados, devido a capacidade de permitir análises comportamentais em animais expostos a situações estressantes em que eles não tem controle da situação, lembrando que o estresse é um dos principais fatores para o desenvolvimento de transtornos do comportamento como a depressão maior (O'Neil *et al.*, 2003; McArthur *et al.*, 2006). Os principais modelos etológicos com exposição a um estresse ambiental utilizados nos estudos da neurobiologia da depressão maior são: estresse crônico variável (ECV), desamparo aprendido (DAp),

nado forçado e a suspensão pela cauda. Os testes do nado forçado e de suspensão pela cauda são os mais utilizados, principalmente devido seu baixo custo e fácil padronização, enquanto o ECV e o DAp são modelos mais complexos e difíceis de serem estabelecidos (McArthur *et al.*, 2006; van der Staay, 2006).

O teste do nado forçado (TNF) é um teste amplamente empregado na identificação de drogas com potencial efeito antidepressivo (O'Neil *et al.*, 2003; McArthur *et al.*, 2006), justamente por possuir boa validade preditiva para a detecção de drogas antidepressivas em uso clínico (O'Neil *et al.*, 2003; Morilak *et al.*, 2004; McArthur *et al.*, 2006). Além disso, também já foi demonstrado que o TNF permite replicar achados clínicos e que ele é de fato útil para compreender melhor o neurocircuito envolvido na depressão e no mecanismo de ação dos antidepressivos (Slattery *et al.*, 2011). O modelo consiste em expor o animal uma situação de estresse inescapável onde ele é colocado em um cilindro preenchido com água. Nos primeiros momentos do teste o animal apresenta um comportamento ativo, buscando escapar da situação, mas logo o animal passa a adotar um comportamento de imobilidade, o qual é atenuado em animais tratados com antidepressivos (Porsolt *et al.*, 1977; Porsolt *et al.*, 2001; O'Neil *et al.*, 2003). Já está bem estabelecido que antidepressivos clássicos, atípicos (McArthur *et al.*, 2006) ou até drogas com potencial antidepressivo, como a ketamina (Li *et al.*, 2010) ou inibidores da NOS (Harkin *et al.*, 1999; Joca *et al.*, 2006), promovem redução do tempo de imobilidade dos animais tratados e expostos ao teste do nado forçado. Outras vantagens desse teste comportamental são o baixo custo e a facilidade de execução, além do fato de se tratar de um estresse brando e indolor (O'Neil *et al.*, 2003).

No entanto, em modelos que dependem da atividade motora, tal como o do nado forçado, o uso de estimulantes psicomotores podem reduzir o tempo de

imobilidade dos animais e levar a observação de resultados falso-positivos. Assim, para poder confiar que os resultados observados são devidos a alterações comportamentais, é avaliado o efeito dos tratamentos eficazes em aumentar o tempo de imobilidade no nado forçado sobre a atividade motora de animais expostos ao teste do campo aberto (Harkin *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2015).

1.2 Córtex pré-frontal e depressão

O sistema límbico é conhecido como o grupo de estruturas do SNC que atuam em conjunto na modulação da resposta comportamental e emocional, tendo destaque dentro desse sistema as seguintes regiões: hipocampo, hipotálamo, amígdala, tálamo, giro cingulado e córtex pré-frontal (Price *et al.*, 2009). O córtex pré-frontal medial (CPFM) vem sendo o foco de diversos estudos comportamentais, uma vez que possui conexões relevantes com a amígdala e outras estruturas límbicas (Price *et al.*, 2009). Além disso, o CPFM está envolvido em funções de alta-ordem como tomada de decisões, memória e aprendizado, bem como participa na modulação autonômica e endócrina de resposta ao estresse (Czeh *et al.*, 2008). Consequentemente, déficits funcionais nessa área cortical parecem favorecer o desenvolvimento de transtornos emocionais, como ansiedade e depressão (Drevets, 2000; Hamani *et al.*, 2009; Musazzi *et al.*, 2010).

Indivíduos deprimidos apresentam aumento da atividade do CPFM e o tratamento com antidepressivos reduz a atividade dessa região de forma diretamente relacionada à melhora do quadro clínico da doença (revisado por Koenigs *et al.*, 2009). Outro fato interessante é que alterações funcionais do CPFM parecem estar relacionadas ao curso temporal do desenvolvimento da depressão, onde a quantidade

de glutamato cortical é inversamente proporcional ao desenvolvimento e cronicidade da doença (Portella *et al.*, 2010).

A divisão do CPFM se dá em uma porção ventral (CPFMv), compreendendo as porções infralímbica (IL) e pré-límbica (PL), e uma porção dorsal que compreende o córtex cingulado anterior (ACC) (Vertes, 2004). O ACC parece mais relacionado a funções motoras, enquanto o CPFMv encontra-se principalmente envolvido com processos emocionais e cognitivos (Heidbreder *et al.*, 2003; Vertes, 2006). Vale destacar que o CPFMv de ratos não ocorre da mesma maneira em humanos, tendo o CPFMv de roedores equivalência funcional ao córtex pré-frontal orbital medial de humanos (Vertes, 2006; Price *et al.*, 2009).

Entre as regiões do CPFMv, o PL merece destaque pois é uma das porções que apresenta mais projeções para estruturas límbicas, tais como o núcleo dorsal da rafe, substância cinzenta periaquedutal e o núcleo basolateral da amígdala (Vertes, 2004; Vertes, 2006). Diversas evidências mostram um papel importante do CPFMv-PL no controle de respostas comportamentais. No controle da resposta emocional condicionada, a microestimulação do PL promoveu o aumento do medo contextual e diminuição da extinção desse tipo de memória aversiva (Vidal-Gonzalez *et al.*, 2006). Já a inativação dessa estrutura foi capaz de reduzir as respostas de medo condicionado (Resstel *et al.*, 2006; Resstel *et al.*, 2008).

Buscando compreender melhor o envolvimento do CPFMv-PL na modulação de respostas emocionais ao estresse, nosso grupo de pesquisa investigou previamente a participação dessa estrutura na modulação das consequências comportamentais induzidas pelo estresse de nado forçado em ratos, onde foi demonstrado que a inativação do PL, com cloreto de cobalto, induz efeito tipo antidepressivo (Scopinho *et al.*, 2010). O mesmo efeito comportamental foi observado

quando administrado o antagonista competitivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, LY 235959, no PL (Pereira *et al.*, 2015). Portanto, esses resultados sugerem que a ativação do CPFMV-PL favorece o desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse que são sensíveis a drogas antidepressivas, sustentando o envolvimento dessa estrutura na neurobiologia da depressão. No entanto, ainda é necessário esclarecer a participação e interação entre os principais sistemas de neurotransmissão presentes no CPFMV-PL no controle da resposta emocional ao estresse.

1.3 Glutamato e depressão

No SNC, as transmissões excitatórias são mediadas principalmente pelo neurotransmissor glutamato, onde ele após liberação na fenda sináptica pode se ligar a diferentes receptores pré ou pós-sinápticos que podem ser ionotrópicos ou metabotrópicos (Kugaya *et al.*, 2005). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos compreendem os receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), do tipo ácido α -amino-3-hidroxy-5-metil-isoxazol-4-propionico (AMPA) e os receptores para kainato (Contractor *et al.*, 2002). Já os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGLUR) se referem a oito subtipos de receptores divididos em três grupos conforme sua homologia estrutural e funcional (Coutinho *et al.*, 2002).

O receptor NMDA (NMDAR) pode ser considerado o principal receptor do sistema glutamatérgico, uma vez que ele tem papel de destaque na mediação de importantes funções dessa neurotransmissão, tais como: cognição, memória, plasticidade neural e neurotoxicidade (Kugaya *et al.*, 2005). O NMDAR é um canal iônico, permeável principalmente ao cálcio, que apresenta uma estrutura tetramérica e possui uma formação heterogênea quanto a composição de suas subunidades

(Paoletti *et al.*, 2013). Até o momento foram identificadas 3 famílias de subunidades que compõem o receptor NMDA, divididas em GluN1, GluN2 ou GluN3, onde majoritariamente a estrutura do receptor é composta por duas subunidades GluN1 e duas GluN2 ou GluN3 (Paoletti *et al.*, 2013). Interessantemente, a formação estrutural do NMDAR varia conforme a região e localização sináptica onde ele é expresso, sendo que sua estrutura também é determinante para funcionalidade do receptor (Paoletti *et al.*, 2013), e tais fatores é que permitem o NMDAR mediar diferentes ações glutamatérgicas (Hardingham *et al.*, 2002; Galvan *et al.*, 2006). De maneira simplificada é possível assumir que os NMDAR localizados na fenda sináptica são formados por subunidades GluN1 e GluN2A, enquanto que os localizados em regiões extrasinápticas são formados por subunidades GluN1 e GluN2B (Paoletti *et al.*, 2013). Corroborando tais informações, estudos demonstram que em condições fisiológicas normais os NMDAR sinápticos é que são predominantemente acionados, assim mantendo o funcionamento neuronal normal; entretanto em condições patológicas que levam a liberação exacerbada de glutamato ocorreria um aumento da ativação dos NMDAR extra-sinápticos, que por sua vez promovem a ativação de mecanismos pró-apoptóticos (Leveille *et al.*, 2008; Hardingham *et al.*, 2010; Gladding *et al.*, 2011).

As primeiras evidências da participação da neurotransmissão glutamatérgica na neurobiologia da depressão foram obtidas a partir de observações de que ratos expostos a um estresse de choque inescapável, utilizado como modelo animal de depressão, apresentavam prejuízo de função mediada pelo receptor glutamatérgico do tipo NMDA no hipocampo (Shors *et al.*, 1989). Dados posteriores mostraram que a exposição a eventos estressores causa aumento da liberação de glutamato no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos (Moghaddam, 1993; Moghaddam, 2002), e que o tratamento sistêmico com antagonistas NMDA produz efeitos do tipo-antidepressivo

no modelo animal do nado forçado (Trullas *et al.*, 1990). Tais efeitos comportamentais dos antagonistas de NMDAR foram sustentados por outros estudos com animais submetidos a diferentes modelos de estresse, tal como o desamparo aprendido, teste de suspensão pela cauda e o estresse crônico variado (Skolnick, 2002; Skolnick *et al.*, 2009). Aliás, dados interessantes mostram que o tratamento antidepressivo farmacológico convencional tem efeitos anti-glutamatérgicos em regiões como hipocampo e córtex pré-frontal, onde eles apresentam ações de reduzir (1) a ativação neuronal mediada pelos receptores NMDA, (2) a expressão dos receptores NMDA e (3) a liberação de glutamato (Nowak *et al.*, 1993; Skolnick *et al.*, 1996; Pittaluga *et al.*, 2007; Musazzi *et al.*, 2012; Nava *et al.*, 2014). Desse modo, é salientado o papel do sistema glutamatérgico via receptores NMDA na neurobiologia da depressão bem como o seu potencial de ser alvo farmacológico de drogas antidepressivas.

A importância dos NMDAR e do sistema glutamatérgico nas pesquisas sobre a depressão maior foi sacramentado pelos estudos clínicos desenvolvidos por Berman *et al.* (2000) e Zarate *et al.* (2006), onde eles demonstraram que uma única administração intravenosa de dose sub efetiva do anestésico ketamina, um antagonista não competitivo de receptores NMDA, induziu um efeito antidepressivo rápido e sustentado por até duas semanas em pacientes com depressão maior e resistentes a outras formas de tratamento farmacológico (Berman *et al.*, 2000; Zarate *et al.*, 2006). Desde então, diversos trabalhos vêm investigando o potencial antidepressivo de diferentes drogas que atuam sobre o sistema glutamatérgico (Kugaya *et al.*, 2005; Mathews *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012; Duman *et al.*, 2014).

Além da ketamina, outras drogas que agem como antagonistas NMDA também vem sendo estudadas. Dentre essas merecem destaque os antagonistas NMDA que agem seletivamente sobre as subunidades desse receptor, tal como os antagonistas

NR2B. Recentemente foi demonstrado que o composto Ro 25-6981 é capaz de produzir efeitos tipo ansiolítico, no teste de hipofagia induzida por novidade (Li *et al.*, 2010), e antidepressivo, no teste do nado forçado, quando injetado sistemicamente em ratos (Maeng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Jimenez-Sanchez *et al.*, 2014). Do mesmo modo, um outro composto antagonista NR2B, o CPP-101,606, produziu efeito antidepressivo em estudo clínico (Preskorn *et al.*, 2008).

Interessantemente, não são apenas os antagonistas dos NMDAR que promovem efeitos antidepressivos. O riluzole é uma droga que atua aumentando a captação de glutamato (Azbill *et al.*, 2000; Frizzo *et al.*, 2004) e inibindo a sua liberação (Wang *et al.*, 2004b; Risterucci *et al.*, 2006), e sua administração, isoladamente, ou associado a outros antidepressivos monoaminérgicos, mostrou ser eficaz em casos de depressão bipolar (Zarate *et al.*, 2005) e em pacientes refratários a outros tratamentos (Zarate *et al.*, 2004; Sanacora *et al.*, 2007).

Uma peculiaridade interessante de alguns antagonistas NMDA é que seus efeitos comportamentais dependem do funcionamento normal dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. Diferentes trabalhos mostram que a administração de antagonistas AMPA, como o NBQX, é capaz de bloquear os efeitos de drogas como a ketamina (Maeng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Levando tais dados em consideração, alguns estudos avaliaram se agonistas dos receptores AMPA induziriam efeitos comportamentais em animais e observaram que de fato tais drogas, como o LY 392098 (Li *et al.*, 2001) e LY 451646 (Lindholm *et al.*, 2012), são capazes de produzir efeitos do tipo-antidepressivo. Corroborando esses achados, há evidências de que o tratamento crônico com antidepressivos monoaminérgicos facilita a neurotransmissão mediada por AMPA, enquanto prejudica a neurotransmissão mediada por NMDA (Barbon *et al.*, 2011; Sanacora *et al.*, 2012)

Outros agentes glutamatérgicos de interesse para o desenvolvimento de novas drogas antidepressivas são as drogas que agem sobre o sítio da glicina. A glicina atua como um co-agonista dos receptores NMDA que quando ligado ao receptor facilita a resposta do mesmo ao glutamato (Skolnick *et al.*, 2009; Paoletti *et al.*, 2013), ou seja, drogas que antagonizem ou reduzam a ligação do agonista pleno nesse sítio, a glicina, poderiam induzir efeitos comportamentais do mesmo modo que os antagonistas NMDA. De fato, já em 1990 foi demonstrado por Trullas & Skolnick que a administração sistêmica de um agonista parcial de glicina, ACPC, é capaz de induzir efeitos do tipo antidepressivo em camundongos expostos ao teste do nado forçado (Trullas *et al.*, 1990). Estudos mais recentes mostram que outro agonista parcial de glicina, o GLYX-13, é capaz de produzir efeitos do tipo antidepressivo em diferentes modelos animais de comportamento, além de também produzir seus efeitos de forma rápida e sustentada, tal como a ketamina (Burgdorf *et al.*, 2013). Ainda de forma semelhante a ketamina, os efeitos do GLYX-13 também são bloqueados pela administração prévia de NBQX (Burgdorf *et al.*, 2013). Vale destacar que a GLYX-13 já está sendo utilizada em estudos clínicos e o pedido para sua aprovação para uso comercial já foi iniciado (Burgdorf *et al.*, 2013).

Aprofundando os dados sobre a participação do glutamato na neurobiologia da depressão, estudos apontam o córtex pré-frontal como uma das principais regiões susceptíveis a alterações dos níveis desse neurotransmissor, uma vez que em pacientes depressivos a quantidade de glutamato cortical encontra-se consideravelmente aumentada quando comparada a indivíduos saudáveis (Sanacora *et al.*, 2004). Relevantemente, também já foi demonstrado que em indivíduos com depressão a atividade do CPFM encontra-se aumentada (Koenigs *et al.*, 2009). Sustentando tais achados em humanos, um estudo com animais espontaneamente

desamparados observou um aumento da taxa glutamato/GABA, em amostras do córtex pré-frontal e do hipocampo (Sartorius *et al.*, 2007), estando este trabalho de acordo com outros que demonstram um aumento de glutamato no SNC em animais estressados (Levine *et al.*, 2000; Kugaya *et al.*, 2005). Semelhantemente, a exposição ao teste do nado forçado também é capaz de aumentar as quantidades de glutamato em regiões corticais (Murakami *et al.*, 2009), o que aparentemente está positivamente relacionado ao desenvolvimento das consequências comportamentais induzidas por esse modelo animal de depressão (Tordera *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010).

Em vista das informações disponíveis é plausível sugerir que quantidades elevadas de glutamato em regiões corticais estariam relacionadas ao desenvolvimento das consequências comportamentais do estresse e à neurobiologia da depressão. De fato, vários trabalhos demonstram que os níveis de glutamato no córtex pré-frontal estão aumentados após a exposição a um evento estressor (Moghaddam, 1993; Zarate *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2004) e, confirmando os dados pré-clínicos em estudos clínicos, indivíduos com depressão maior apresentam aumento dos níveis de glutamato em determinadas estruturas corticais (Zarate *et al.*, 2003; Sanacora *et al.*, 2004). De acordo com Zarate *et al.* (2003), um aumento nas quantidades extracelulares de glutamato pode resultar na ativação persistente de receptores NMDA, assim elevando excessivamente a concentração intracelular de cálcio e contribuindo para o desenvolvimento de mecanismos de neurotoxicidade, sobretudo através da ativação de enzimas dependentes de cálcio e da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por exemplo o óxido nítrico (NO) (Zarate *et al.*, 2003). Além disso, o excesso de glutamato extracelular poderia aumentar a ativação dos NMDAR extra-sinápticos, desencadeando mecanismos pró-apoptóticos mediados por esse tipo de receptor (Leveille *et al.*, 2008; Hardingham *et al.*, 2010;

Gladding *et al.*, 2011). As consequências dos acontecimentos apresentados acima seriam devido a prejuízos estruturais e funcionais no SNC, tal como é observado em indivíduos deprimidos e em estruturas límbicas de animais expostos ao estresse (McEwen *et al.*, 1997; Campbell *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2010). Essas proposições são suportadas por evidências de que o tratamento com antidepressivos pode atenuar tanto o aumento de glutamato no SNC quanto as alterações plásticas induzidas pelo estresse (Castren, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Murakami *et al.*, 2009).

Ratificando a ideia de que a hiperatividade glutamatérgica devido a episódios estressantes resulta em prejuízo da resposta comportamental através de danos plásticos no SNC, um trabalho recente demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado da ketamina depende de alterações plásticas que ocorrem no CPFMV, através da ativação do alvo mecânico da rapamicina (mTOR), uma proteína quinase envolvida no controle da síntese proteica (Li *et al.*, 2010). A mTOR é um alvo comum de diferentes vias envolvidas na promoção de mecanismos plásticos (Hoeffer *et al.*, 2010), tais como sobrevivência neuronal e arborização dendrítica, sendo que essas vias estão envolvidas na melhora clínica de pacientes deprimidos tratados com antidepressivos convencionais (Calabrese *et al.*, 2009). Assim, o conjunto de dados apresentados sustentam a hipótese de que o aumento da atividade do sistema glutamatérgico, ocasionando o aumento da liberação de glutamato, ativação dos NMDAR estaria envolvido na neurobiologia da depressão e apontam esse sistema como um novo alvo para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da depressão maior.

1.4 Óxido nítrico e Depressão

O óxido nítrico (NO) é um gás com importantes funções fisiológicas e patológicas no organismo. A produção do NO se dá através da ação da enzima conhecida como óxido nítrico sintase (NOS), existindo quatro isoformas dessa enzima, sendo elas: a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS), a NOS induzida (iNOS) e a NOS mitocondrial (mtNOS) (Moncada *et al.*, 1997; Ghafourifar *et al.*, 2005; Guix *et al.*, 2005). As isoformas eNOS, nNOS e mtNOS são constitutivas, sendo classificadas segundo o tecido no qual foram encontradas pela primeira vez, eNOS no tecido endotelial, nNOS no sistema nervoso central (principalmente no córtex, hipocampo e cerebelo) e periférico, mtNOS nas mitocôndrias, onde participam principalmente de processos que envolvem a sinalização celular ou consumo de oxigênio no caso da mtNOS (Moncada *et al.*, 1997; Ghafourifar *et al.*, 2005; Guix *et al.*, 2005). A iNOS foi identificada inicialmente em células do sistema imune, como macrófagos e células da glia, tem sua expressão induzida, principalmente, por processos imunológicos ou inflamatórios (Moncada *et al.*, 1997; Ghafourifar *et al.*, 2005; Guix *et al.*, 2005). Entretanto, existem dados indicando uma baixa expressão constitutiva da iNOS (Moncada *et al.*, 1997; Guix *et al.*, 2005). Portanto, considerando que a expressão da NOS ocorre tanto na periferia quanto no SNC, fica claro que a produção de NO é um processo essencial para uma grande variedade de processos biológicos e patológicos.

No que diz respeito ao SNC, a produção de NO se dá majoritariamente em resposta a ativação de receptores NMDA (Garthwaite *et al.*, 1989). Quando ativados, os receptores NMDA promovem o influxo de Ca^{+2} para o neurônio, permitindo a formação do complexo cálcio-calmodulina que por sua vez estimula a produção de NO através nNOS (Guix *et al.*, 2005). Este processo ocorre devido a nNOS estar ancorada ao receptor NMDA pela proteína PSD-95 em regiões pós-sinápticas

(Christopherson *et al.*, 1999). Então, a nNOS quando ligada ao complexo cálcio-calmodulina tem seu sítio catalítico ativado e assim converte L-arginina em L-citrulina, liberando NO como subproduto (Guix *et al.*, 2005; Gregers Wegener, 2010). O NO produzido tem grande capacidade de difusão e pode se ligar a resíduos de tirosina ou de cisteína de diferentes proteínas e enzimas e, assim, interferir em seu funcionamento, porém o seu principal alvo é a ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC), que resulta em aumento dos níveis de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) (Guix *et al.*, 2005; Gregers Wegener, 2010; Dhir *et al.*, 2011). O cGMP é um importante mensageiro secundário envolvido na ativação de proteínas quinases e fosfodiesterases, assim participando de importantes vias intracelulares envolvidas em diferentes efeitos, incluindo liberação de neurotransmissores (Guix *et al.*, 2005; Dhir *et al.*, 2011). Desse modo, o NO pode interferir na comunicação celular de diferentes sistemas e, em excesso, pode causar danos celulares, pois pode interagir com resíduos de diferentes proteínas, promovendo s-nitrosilação, e assim prejudicar o funcionamento delas (Calabrese *et al.*, 2007); sendo que ao reagir com superóxidos ele leva a formação de peroxinitrito, uma substância capaz de danificar o DNA, proteínas e lipídios (Hara *et al.*, 2007). Portanto, através dos mecanismos mencionados o NO tem a capacidade de modular diversos processos no SNC, dando-se destaque para a liberação de neurotransmissores e a plasticidade neuronal (Skolnick *et al.*, 2003; Calabrese *et al.*, 2007).

Como consequência, as ações fisiológicas do NO no SNC resultam em diversos efeitos, podendo envolver a modulação de mecanismos de memória, uma vez que estudos com animais demonstram que a redução dos níveis basais de NO prejudica a formação de memória (Yamada *et al.*, 1998; Guix *et al.*, 2005); a modulação de respostas comportamentais ao estresse, já que evidências sugerem que reduzir a

formação de NO através da inibição da nNOS tem efeito tipo -ansiolítico e – antidepressivo (Harkin *et al.*, 1999; Joca *et al.*, 2007); na plasticidade neural e no controle dos mecanismos de apoptose (Akaike *et al.*, 1999; Guix *et al.*, 2005). Todavia, quando produzido em excesso, especialmente em situações patológicas, o NO pode desencadear efeitos nocivos e assim causar morte celular, tal como descrito anteriormente (Pryor *et al.*, 2006).

No que se refere aos estudos sobre a neurobiologia da depressão, o envolvimento do NO é evidenciado por muitos trabalhos que demonstram o efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração sistêmica de diferentes inibidores da NOS em animais submetidos a diferentes modelos pré-clínicos, tais como o nado forçado (Jefferys *et al.*, 1996; Yildiz *et al.*, 2000; Joca *et al.*, 2006), estresse crônico variado (Zhou *et al.*, 2007; Mutlu *et al.*, 2009) e desamparo aprendido (Joca *et al.*, 2008). Reforçando o envolvimento do NO na neurobiologia da depressão, evidências indicam que ele pode reduzir a liberação de serotonina, noradrenalina e a aumentar a de glutamato, como também pode inativar a serotonina e a enzima limitante da sua síntese (revisado por Guix *et al.*, 2005; Wegener, 2010; Dhir *et al.*, 2011). A administração de L-arginina, molécula precursora para a formação de NO, reduz a liberação de serotonina e dopamina no hipocampo (Wegener *et al.*, 2000) e também é capaz de bloquear os efeitos de antidepressivos monoaminérgicos como, a imipramina (Harkin *et al.*, 1999) e a venlafaxina (Dhir *et al.*, 2007). De forma contrária, a administração de L-n-nitroarginina (L-NNA), um falso substrato para a NOS que resulta em redução da produção de NO, mostrou ser capaz de reduzir “turnover” de serotonina no córtex pré-frontal de ratos de forma similar aos efeitos da imipramina (Karolewicz *et al.*, 2001). Nesse sentido, o uso de inibidores da NOS, como 7-NI e azul de metileno, demonstrou promover um aumento na concentração extracelular de

serotonina e dopamina no hipocampo de ratos (Wegener *et al.*, 2000). Doses subefetivas de outros inibidores da NOS, como L-NAME, L-NA e 7-NI, são capazes de potencializar o efeito de antidepressivos como a imipramina e fluoxetina (Harkin *et al.*, 2003; Harkin *et al.*, 2004). Interessantemente, foi visto que um outro antidepressivo ISRS, a paroxetina, também age como inibidor da NOS (Finkel *et al.*, 1996). Outro achado interessante se deve a observação de que antidepressivos monoaminérgicos, como imipramina, paroxetina, citalopram e fluoxetina, são capazes de diminuir a atividade nitrérgica no SNC, podendo reduzir a expressão de nNOS (Zhang *et al.*, 2010) ou a produção de NO (Wegener *et al.*, 2003). Corroborando a interação dos sistemas nitrérgico e monoaminérgico na neurobiologia da depressão, já foi demonstrado que o efeito tipo antidepressivo dos inibidores seletivos da nNOS, TRIM, 7-NI ou L-NA, são dependentes da atividade do sistema serotoninérgico, uma vez que a depleção de serotonina abole o efeito tipo antidepressivo do 7-NI e L-NA no TNF (Harkin *et al.*, 2003) e o uso de antagonista 5-HT_{2c} bloqueia os efeitos TRIM também no TNF (Ulak *et al.*, 2010).

Embora existam, atualmente, inibidores seletivos ou preferenciais para a nNOS que tem apresentado efeito do tipo-antidepressivo em estudos pré-clínicos, tais como 7-NI (Harkin *et al.*, 2003; Joca *et al.*, 2006) e TRIM (Mutlu *et al.*, 2009; Gigliucci *et al.*, 2014), ainda não se dispõe de drogas dessa classe para uso clínico. Entretanto, uma nova categoria de drogas que agem sobre o sistema nitrérgico vem sendo estudada e tem fornecido resultados promissores. Essas drogas atuam promovendo o desligamento da PSD-95 do NMDAR, assim retirando a proximidade da nNOS do NMDAR e conseqüentemente reduzindo a ativação dessa enzima (Doucet *et al.*, 2012). Os estudos realizados demonstram que os compostos IC87201 e ZL006 são capazes de induzir de forma sustentada (até 72 horas) efeitos do tipo antidepressivo

em animais expostos a modelos preditivos de efeito antidepressivo, como o teste de suspensão pela cauda e o teste do nado forçado (Doucet *et al.*, 2013).

Em humanos, existem evidências de níveis séricos elevados de nitrito (medida indireta da formação de NO) e aumento da expressão da nNOS em indivíduos deprimidos (revisado por Dhir *et al.*, 2011). Além disso, outras evidências indicam a existência de polimorfismos nos genes da nNOS e iNOS de forma diretamente relacionada a susceptibilidade para o desenvolvimento da depressão maior (Galecki *et al.*, 2010). De acordo com os dados acima, a administração crônica de uso de azul de metileno, um inibidor da NOS e da sGC (Volke *et al.*, 1999), demonstrou efeito antidepressivo em humanos (Naylor *et al.*, 1987).

Analisando as informações descritas até aqui é possível observar que a hiperatividade da via NMDA-NO tem papel prejudicial importante que contribui para o desenvolvimento das consequências comportamentais da exposição ao estresse, tal como a depressão maior, e então essa via fornece alvos farmacológicos de grande interesse para a compreensão da neurobiologia da depressão tanto quanto para o desenvolvimento de drogas de ação rápida e sustentada para o tratamento desse transtorno.

1.5 BDNF e Depressão

Os fatores de crescimento do sistema nervoso, conhecidos por neurotrofinas, são mediadores responsáveis por funções essenciais para a sobrevivência, crescimento e maturação dos diferentes tipos celulares que compõem o SNC (revisado por Nagahara *et al.*, 2011). Já foram identificados aproximadamente cinquenta diferentes neurotrofinas que são divididas conforme as suas similaridades estruturais (revisado por Nagahara *et al.*, 2011). Dentre esse abundante grupo de mediadores, é de nosso

interesse o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) devido aos seus efeitos contínuos sobre as funções neuronais durante a idade adulta e a modulação de sua expressão pelo estresse e por drogas antidepressivas (Castren *et al.*, 2010; Nagahara *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011).

O BDNF é uma das neurotrofinas presentes em maior quantidade em todo o SNC, onde ela pode estar presente em duas formas: (1) como pró-BDNF, forma na qual ele é armazenado nas vesículas sinápticas, ou como BDNF maduro, forma extracelular gerada após clivagem proteolítica por plasmina ou metaloproteinases (revisado por Nagahara *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011). Essa distinção é importante pois está diretamente ligada a afinidade que cada forma do BDNF tem para se ligar aos receptores dessa neurotrofinas. Os receptores aos quais o BDNF pode se ligar são os receptores do tipo tirosina quinase (Trk), divididos em A, B e C, e o receptor p75 (revisado por Castren *et al.*, 2010; Nagahara *et al.*, 2011). Após ser secretado, a grande maioria do pró-BDNF é convertido em BDNF, porém a pequena quantidade restante da forma imatura dessa neurotrofina ainda pode se ligar a receptores, sendo que ela tem maior afinidade receptores p75, TrkA e TrkC, os quais, principalmente o p75, estão ligados a ativação de mecanismos pró-apoptóticos e de morte celular (revisado por Nagahara *et al.*, 2011). Entretanto, além da expressão dos receptores p75, TrkA e TrkC ser menor em relação ao receptor TrkB, o BDNF também possui maior afinidade para o TrkB, sendo este o principal responsável pelas importantes atividades biológicas da forma madura do BDNF (revisado por Castren *et al.*, 2010; Nagahara *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011).

Quando ligado ao TrkB, o BDNF pode promover a ativação de três vias de sinalização intracelular, a via da *proteína-quinase regulada por mitogene – quinase regulada por sinal extracelular* (MEK-ERK), da *fosfoinositol 3-quinase – AKT* (PI3K-

AKT) e da *fosfolipase C – gama 1* (PLC γ 1) (revisado por Martin *et al.*, 2011; Nagahara *et al.*, 2011). A via da MEK-ERK está relacionada a manutenção da plasticidade sináptica e da estrutura e função neuronal no cérebro adulto, enquanto a ativação da PI3K-AKT apresenta-se relacionada aos processos de sobrevivência neuronal (revisado por Massa *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2011; Nagahara *et al.*, 2011). A sinalização via PLC γ 1 resulta na ativação de IP3 e diacilglicerol (DAG), de modo a promover a mobilização de cálcio intracelular e ativar proteínas quinases cálcio dependentes que influenciam na plasticidade sináptica (revisado por Martin *et al.*, 2011; Nagahara *et al.*, 2011). Além disso, o alvo mecânico da rapamicina, a mTOR, que está envolvida na ativação de mecanismos de transcrição gênica para a síntese proteica, parece ser um alvo comum às vias do TrkB na promoção dos efeitos plásticos do BDNF (revisado por Costa-Mattioli *et al.*, 2013). Os efeitos do BDNF na plasticidade sináptica podem prevenir a degeneração neuronal (Massa *et al.*, 2010); facilitar a potenciação de longo prazo (Figurov *et al.*, 1996) e melhorar processos cognitivos como memória e aprendizado (Yamada *et al.*, 2002). Entretanto, a exposição a situações estressantes pode levar a uma redução dos níveis de BDNF, permitindo o desenvolvimento de atrofia de estruturas límbicas e menor atividade das mesmas (revisado por Stone, 2007). De acordo com tais dados, foi visto que a exposição de animais a diferentes modelos envolvendo estresse, como o nado forçado, choque nas patas, imobilização, estresse crônico variado e privação maternal, é capaz de reduzir a expressão de BDNF e das vias intracelulares por ele acionadas em regiões do SNC como o córtex pré-frontal e hipocampo (Yu *et al.*, 2011).

Nesse sentido, foi observado que pacientes depressivos apresentam redução nas quantidades séricas de BDNF, além de já ter sido visto uma correlação entre polimorfismo do gene do BDNF e o desenvolvimento da depressão bipolar

(Schumacher *et al.*, 2005; Post, 2007). Em estudos pós-morte com cérebros de pacientes depressivos suicidas foi visto que a expressão de BDNF e TrkB estavam reduzidas, principalmente no córtex pré-frontal e hipocampo (Martinowich *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2011), sendo que já foi observada uma correlação entre o comportamento suicida e baixas quantidades de BDNF sérico (Devecei *et al.*, 2007). Confirmando a participação do BDNF na neurobiologia da depressão, o tratamento com antidepressivos convencionais, como venlafaxina, paroxetina, clomipramina e escitalopram, é capaz de normalizar as quantidades de BDNF de forma relacionada à melhora do quadro clínico dos pacientes (Sen *et al.*, 2008; Nagahara *et al.*, 2011; Ricci *et al.*, 2011). Em estudos pré-clínicos existem ainda mais evidências do papel do BDNF na depressão. Existem dados demonstrando que antidepressivos, como imipramina e fluoxetina, podem promover a ativação direta do receptor TrkB e em animais geneticamente modificados para expressarem uma isoforma truncada do TrkB o uso desses antidepressivos não foi capaz de melhorar a resposta comportamental desses animais quando expostos ao teste do nado forçado (Saarelainen *et al.*, 2003). Além do mais, em outro estudo com animais geneticamente modificados para um polimorfismo do BDNF foi observado um volume reduzido do córtex pré-frontal (Yu *et al.*, 2009). Apoiando as evidências acima, já foram publicados diversos trabalhos mostrando que o tratamento crônico/repetido com antidepressivos utilizados na clínica, destacadamente os ISRS, são capazes de promover o aumento da expressão BDNF e TrkB, principalmente no córtex pré-frontal e hipocampo, de forma diretamente relacionada a seus efeitos comportamentais (Martinowich *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Dessa maneira, atualmente já existe uma quantidade considerável de estudos pré-clínicos demonstrando que os efeitos do tratamento crônico com diferentes classes de antidepressivos que agem sobre o

sistema monoaminérgico são capazes de aumentar a expressão de BDNF no SNC, principalmente no córtex frontal e hipocampo (revisado por Martinowich *et al.*, 2007, Castren *et al.*, 2010, Nagahara *et al.*, 2011).

Interessantemente, o uso de antagonistas NMDA, como a ketamina e o MK-801, em animais, promove um aumento rápido na síntese de BDNF, onde também foi visto que os efeitos antidepressivos rápidos produzidos por essas drogas são dependentes desse aumento (Autry *et al.*, 2011). Inclusive, em estudo recente de Ricci *et al.*, 2011, foi relatado que indivíduos que fazem uso recreativo de ketamina apresentam quantidades de BDNF elevadas no sangue (Ricci *et al.*, 2011). Reiterando esses achados, a administração de um anticorpo anti-BDNF, no CPFM, foi capaz de impedir o efeito tipo antidepressivo da ketamina no teste do nado forçado (Lepack *et al.*, 2014). Do mesmo modo como visto com os antidepressivos convencionais, a ketamina não é capaz de induzir respostas do tipo antidepressiva em animais geneticamente modificados para um polimorfismo no BDNF (Liu *et al.*, 2012). Assim, parece ser importante, tanto para os antidepressivos convencionais quanto para as novas drogas glutamatérgicas, que a via do BDNF seja apropriadamente acionada para a observação dos efeitos comportamentais dessas drogas.

Um dos pontos da via BDNF-TrkB que vem sendo amplamente estudado na neurobiologia da depressão é justamente a mTOR (Costa-Mattioli *et al.*, 2013), principalmente devido sua importância na plasticidade neuronal e nos processos de memória (Hoeffler *et al.*, 2010). A mTOR é encontrada nas células em dois complexos distintos de proteínas, sendo o complexo 1 (mTORC1) identificado como aquele que é sensível a rapamicina e o complexo 2 (mTOR2) é insensível a rapamicina, embora a mTORC2 não seja totalmente insensível a rapamicina pois pode ser inibida por esta droga após exposição crônica (Hoeffler *et al.*, 2010; Costa-Mattioli *et al.*, 2013). O

mTORC1 representa o principal efetor das ações da mTOR, sendo que ele é ativado principalmente em resposta a sinais sinápticos mediados por receptores de neurotrofinas e receptores glutamatérgicos (Hoeffer *et al.*, 2010; Costa-Mattioli *et al.*, 2013). A principal via de sinalização responsável pela ativação do mTORC1 é a PI3k-Akt, sendo que a via da MEK/ERK também é capaz de ativar esse complexo (Browne *et al.*, 2013; Costa-Mattioli *et al.*, 2013). Recentemente, a mTOR passou a ser extensivamente explorada em transtornos psiquiátricos devido a achados que demonstraram o seu envolvimento no mecanismo de ação nos efeitos antidepressivos rápidos de antagonistas NMDA, principalmente a ketamina (Li *et al.*, 2010; Costa-Mattioli *et al.*, 2013). O MK-801, um antagonista NMDA, mostrou ser capaz de aumentar a síntese de proteínas sinápticas de forma dependente da ativação da mTOR no córtex pré-frontal de ratos (Yoon *et al.*, 2008). Li *et al.*, 2010 e 2011, mostrou que os efeitos antidepressivos de antagonistas glutamatérgicos, tal como a ketamina ou Ro 25-6981, são bloqueados pela inibição da mTOR com rapamicina, no CPFMV de ratos. Adicionalmente, o trabalho de Li *et al.* 2010, também evidenciou que os efeitos comportamentais da ketamina em ratos são relacionados a um aumento rápido da síntese protéica e do número de botões sinápticos no CPFMV, porém tais efeitos são bloqueados pela administração local de rapamicina (Li *et al.*, 2010; Nanxin Li, 2011). Esses dados reiteram a participação da via BDNF-TrkB-mTOR no mecanismo de ação de drogas antidepressivas com ação rápida, tal como apoiam a necessidade de mais estudos sobre o envolvimento de mecanismos plásticos promovidos pelas drogas com ação antidepressiva nas diferentes estruturas do SNC relacionadas a distúrbios psiquiátricos.

Finalmente, considerando-se as evidências disponíveis, pode ser sugerido que o aumento da liberação de glutamato promovido pelo estresse, com consequente

aumento das quantidades de NO (Akaike *et al.*, 1999) e queda nos níveis de BDNF resulte em mecanismos neurotóxicos exacerbados, desse modo ocasionando prejuízos plásticos e funcionais que podem culminar em transtornos do comportamento como a depressão maior.

1.5.1 Antagonistas do receptor TrkB e inibidores da mTOR

Existem diversos agentes farmacológicos que podem atuar antagonizando os receptores TrkB ou inibindo a mTOR, porém os dois principais fármacos capazes de agir sobre esses alvos ainda são os mesmos que foram descobertos a mais de duas décadas, sendo eles (1) o K252a que é amplamente utilizado para antagonizar os efeitos do BDNF no receptor TrkB e (2) a rapamicina que deu nome a proteína a qual atua sobre e é seu principal inibidor, a mTOR.

Os compostos nomeados de K252 são metabólitos encontrados nas bactérias *Norcardiopsis sp.* e *Actinomadura sp.*, onde K252a foi o primeiro a ser identificado, seguido dos compostos K252b, c e d. O principal mecanismo de ação observado nesse grupo de moléculas é a capacidade deles serem potentes inibidores de uma série de proteínas quinases, dentre as quais os principais alvos estudados são a proteína kinase C (PKC) e os receptores do tipo tirosina kinase (A, B ou C) (Knusel *et al.*, 1992; Kaneko *et al.*, 1997). Por causa da ação em inibir os receptores alvo de diferentes neurotrofinas, os compostos K252 se tornaram importantes ferramentas farmacológicas nos estudos dos mecanismos de sobrevivência e proliferação neuronal (Knusel *et al.*, 1992), sendo que o K252a e o K252b foram os primeiros compostos modelo para o desenvolvimento de outras moléculas inibidoras dos receptores Trk (Knusel *et al.*, 1992; Kaneko *et al.*, 1997). Entranto, com a intensificação dos estudos sobre neurotrofinas e o esclarecimento da importância dessas substâncias para a sobrevivência e manutenção neuronal, novos agentes

mais específicos para os subtipos dos receptores Trk vem sendo desenvolvidos, mas mesmo assim o K252a continua como uma das principais ferramentas para os estudos envolvendo o bloqueio das ações das neurotrofinas (Longo *et al.*, 2013).

A rapamicina também é um metabólito derivado de uma bactéria (*Streptomyces hygroscopicus*) e foi descoberta em amostras de solo coletadas por um grupo de expedicionários canadenses em 1965 na ilha de Rapa Nui (Kunz *et al.*, 1993). A partir da sua descoberta, a rapamicina ajudou a elucidar importantes processos biológicos, tanto que a sua principal proteína alvo foi nomeada em função dela, como *alvo mecânico da rapamicina* (Kunz *et al.*, 1993). Essa droga, quando administrada aguda ou cronicamente, atua inibindo o complexo 1 da mTOR (mTORC1) ao bloquear o principal sítio catalítico do complexo (Costa-Mattioli *et al.*, 2013). Apenas quando utilizada cronicamente, a rapamicina é capaz de também inibir o complexo 2 da mTOR (mTORC2), porém o mecanismo pelo qual acontece essa inibição ainda está sendo elucidado (Costa-Mattioli *et al.*, 2013). Entre os dois complexos da mTOR o complexo 1 é o que, até o momento, apresenta maior atividade e importância biológica identificada (Costa-Mattioli *et al.*, 2013). Através desse mecanismo de ação foi possível utilizar a rapamicina como um importante imunossupressor e agente anti-câncer, sendo que a partir dela foram desenvolvidas novas drogas conhecidas como “rapalogs”, citando por exemplo o temsirolimus e o everolimus que são utilizados no tratamento de tumores sólidos (Kunz *et al.*, 1993; Salvadori, 2012; Costa-Mattioli *et al.*, 2013). Quanto ao SNC, a rapamicina tem se mostrado uma importante ferramenta farmacológica para o estudo do envolvimento da mTOR em diversos transtornos neuropsiquiátricos, tal como a depressão maior e esquizofrenia, pois ela está diretamente envolvida em mecanismos de controle de crescimento, sobrevivência e

manutenção neuronal e assim, conseqüentemente, na funcionalidade do SNC (Hoeffer *et al.*, 2010; Costa-Mattioli *et al.*, 2013; Gururajan *et al.*, 2014).

2. Hipótese

O estresse promove a liberação de glutamato e ativação de receptores NMDA, com consequente aumento da produção de NO, no CPFMV-PL. Essa sinalização prejudica a sinalização local mediada por BDNF-TrkB e mTOR, favorecendo o estabelecimento de alterações comportamentais do estresse.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Testar a hipótese de que bloqueio dos receptores NMDA e a inibição da produção de NO, no CPFMV-PL, melhora a resposta comportamental ao estresse de forma dependente da atividade da via BDNF-TrkB e mTOR.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito da administração de inibidor da nNOS (NPA), seqüestrador de NO (c-PTIO) ou inibidor da guanilato ciclase (ODQ) no CPFMV-PL de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

- Avaliar se a administração de antagonista dos receptores AMPA bloqueia o efeito da administração de LY 235959 (antagonista NMDA) ou NPA, no CPFMV-PL de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

- Avaliar se a administração de antagonista dos receptores Trk bloqueia o efeito da administração de BDNF, LY 235959 ou NPA, no CPFMV-PL de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

- Avaliar se a administração de inibidor da mTOR bloqueia o efeito da administração de BDNF, LY 235959 ou NPA de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

- Avaliar se a administração de antagonista dos receptores Trk ou inibidor da mTOR, no CPFMV-PL, bloqueia o efeito da administração sistêmica de ketamina (antagonista NMDA) ou 7-NI (inibidor da nNOS), em ratos submetidos ao teste do nado forçado.

- Avaliar a expressão do receptor TrkB e da mTOR (quantidades totais e fosforiladas), no CPFM de ratos submetidos ao pré-teste do nado forçado e tratados sistemicamente com ketamina, 7-NI (inibidor da nNOS).

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, 240 a 280 gramas, provenientes do Biotério Central USP, Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos aos pares, em caixas de acrílico (570 cm²), no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), em condições controladas: temperatura (24 ± 1 °C), ciclo de luz (acesas das 6:00 às 18:00 horas), sem privação de alimento e água exceto durante a realização do experimento. Aprovação no comitê de ética: CEUA 09.1.1617.53.2.

4.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: LY 235959 (LY, Tocris), antagonista seletivo dos receptores de glutamato tipo NMDA; 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[*f*]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX, Tocris), antagonista seletivo dos receptores de glutamato do tipo AMPA; Ketamina (Cristália – Brasil), antagonista dos receptores de glutamato tipo NMDA; 7-nitro-indazol (7-NI, Sigma-Aldrich), inibidor preferencial da nNOS; *N*⁶-[Imino(propylamino)methyl]-L-ornithine hydrochloride (NPA, Tocris), inibidor seletivo da nNOS; 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO, Tocris), sequestrador de NO; 1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ, Tocris), inibidor de guanilato ciclase solúvel; Rapamicina (RPC, LC Laboratories), inidor da mTOR; K252a (Sigma-Aldrich), antagonista de receptores TRK ; BDNF humano recombinante, rhBDNF (Promega), agonista dos receptores TrKB. As drogas foram dissolvidas em salina estéril, ou veículo adequado, imediatamente antes do uso.

Além disso, foram utilizados durante os procedimentos cirúrgicos: 2,2,2-tribromoetanol (Sigma-Aldrich, 2,5%, 10mL/Kg); Banamine (Schering-Plough, 0,25%, 0,1 mL/100g), Lidocaína (PROBEM 3%, 0,2 mL); e pentabiótico veterinário (Fort Dodge, 1.200.000 UI, benzilpenicilina benzatina 600.000 UI, benzilpenicilina procaína 300.000 UI, benzilpenicilina potássica 300.000 UI, diidroestreptomicina base (sulfato) 250 mg e estreptomicina base (sulfato) 250 mg, 0,1 mL/100g).

4.3 Protocolos Experimentais

4.3.1 Cirurgia estereotáxica e administração intracerebral de drogas

Os ratos foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (i.p., 2,5%) na dose de 1 mL/100g e fixados na armação estereotáxica. Uma cânula guia (11,0 mm OD) de aço inoxidável foi implantada bilateralmente e direcionada para o córtex pré-frontal medial pré-límbico (coordenadas: Antero-posterior: +3,3 mm, lateral: +1,9 mm, vertical: -2,4 mm do crânio com uma inclinação lateral de 22°) e para o córtex pré-frontal medial infra-límbico (coordenadas: Antero-posterior: +3,3 mm, lateral: +2,7 mm, vertical: -3,2 mm do crânio com uma inclinação lateral de 24°), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1997). A ponta da cânula estava 1,0 mm acima do local da injeção e a cânula foi presa ao crânio por parafuso de aço e cimento acrílico. Um mandril foi colocado na cânula guia para evitar sua obstrução. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam administração de pentabiótico veterinário (i.m., 0,1 mL/100g) e do antiinflamatório Banamine (0,1 mL/100g), com o objetivo de evitar quadros infecciosos e reduzir a dor pós-operatória. Ao final da cirurgia, os animais eram acondicionados em uma gaiola com aquecimento, onde permaneceram sob observação por 30 minutos. Após esse período, os animais

retornavam às suas gaiolas, onde permaneceram em repouso por 5-7 dias, até o início dos experimentos.

Posteriormente, foram realizados os experimentos comportamentais e as injeções intracerebrais, as quais foram administradas com auxílio de agulhas dentárias (0,3 mm OD) que eram introduzidas bilateralmente através da cânula guia (1,0 mm abaixo do fim da cânula). Foi injetado um volume de 0,2 µL/lado, na velocidade de 1 µL/min, usando uma microseringa controlada por uma bomba de infusão.

4.3.2 Análise histológica dos sítios de administração de drogas

Ao término dos experimentos comportamentais, os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral 5% e perfundidos com salina isotônica seguida por solução de formalina 10%. Após a perfusão, uma agulha dentária era inserida na cânula guia e 0,2 µl do corante de *azul de evans* foi injetado bilateralmente. Os cérebros foram removidos e imersos em solução de formalina 10%, a fim de serem posteriormente (3-4 dias) seccionados em criostato (Cryocut 1800, -18 °C) numa espessura de 40 µm. Os sítios das injeções foram registrados em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1998), sendo desconsiderados da análise estatística os dados dos animais cujo local da injeção se encontrou fora do córtex pré-frontal medial pré-límbico.

4.3.3 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado é um modelo animal usado para verificar os efeitos comportamentais induzidos por drogas antidepressivas que, neste caso, são evidenciados através da redução da imobilidade durante o teste (Porsolt et al 1977) O modelo consistiu em colocar os animais para nadar, individualmente, em um cilindro de plástico (30 cm de diâmetro, 40 cm de altura), contendo 25 cm de água com

temperatura de $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 15 min (pré-teste) (adaptado de Joca & Guimaraes 2006). Após esse período, os animais foram retirados e colocados, separadamente, para secar, antes de retornarem para suas caixas de origem. Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a sessões de 5 minutos de nado forçado, quando se registrou o tempo total de imobilidade (o animal permaneceu parado realizando apenas pequenos movimentos necessários para a flutuação), de maneira cega. A água era trocada entre as sessões de nado para evitar a influência de substâncias de alarme (Abel & Bilitzke 1990).

4.3.4 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto é um modelo animal usado para verificar a atividade locomotora e exploratória do animal. O modelo consiste em colocar os animais para se locomoverem livremente, individualmente, no centro de uma caixa quadrada de madeira (72 cm x 72 cm, 40 cm de altura), dividida em 16 quadrantes (18 cm x 18 cm), por um período de 5 min (adaptado de Strauss et al 2003). Durante esse período, foi contado o número de cruzamentos que o animal fez entre os quadrantes, sendo que cada cruzamento só é contado quando o animal atravessa com as quatro patas de um quadrante para o outro.

4.3.5 Extração de proteínas

Os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 5% (10mL/Kg), decapitados e o CPFM dissecado (com agulha de *punch* de 4 mm) e homogeneizado em tampão de lise (NaCl 137 mM; Tris-HCl 20mM pH 7,6; glicerol 10% e ortovanadato de sódio 0.05%), complementado com coquetel inibidor de proteases (Sigma, USA), inibidor de tirosina fosfatases e inibidor de serina fosfatase.

O homogenato foi centrifugado a 9000 x g por 15min e o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C. Os níveis de proteínas totais foram determinados pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e utilizados para normalizar a quantidade de amostra utilizada nos ensaios de western blotting.

4.3.6 Análise da expressão de trkB e mTOR por Western Blotting

A expressão de TrkB (proteína total e fosforilada – p-TrkB) e mTOR (proteína total e fosforilada – p-mTOR) foram determinados por *western blotting*, seguindo protocolos descritos na literatura (Li *et al.*, 2010; Autry *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Brevemente, trinta microgramas (µg) de proteínas totais contidas nas amostras foram separadas em gel de poliacrilamida a 12% e transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno). Após bloqueio com solução de soroalbumina bovina (BSA) 5% em tampão TBST (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 0.05% Tween80, pH 7.6), as membranas foram incubadas com o anticorpo primário contra: trkB, p-trkB, mTOR ou p-mTOR *overnight* a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, adequado à espécie onde foi gerado o anticorpo primário. Após as lavagens com tampão TBST a marcação obtida por reagente cromogênico foi escaneada e digitalizada.

A expressão de p-TrkB e p-mTOR, foi normalizada pelos níveis de TrkB ou mTOR total presente em cada amostra. Para tal, após o procedimento de *mild stripping* com solução contendo beta-mercaptoetanol (0.8% em tampão TBS, por 30 min a 50°C), as membranas foram lavadas, em TBS e TBST 0,05%, e novamente incubadas com BSA 5% em TBST. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo contra TrkB ou mTOR (*overnight*, 4°C), seguido pelo anticorpo secundário

conjugado a peroxidase. Por último, as membranas foram reveladas conforme descrito anteriormente.

Os valores de densidade ótica para cada amostra foram normalizados pelos valores dos normalizadores e expressos como porcentagem sobre o grupo controle.

4.5. Desenho Experimental

4.4.1. Experimentos com injeção central de drogas

Nestes experimentos buscou-se elucidar se o bloqueio dos receptores NMDA, ou da nNOS, ou da sGC, no CPFMV-PL seria capaz de produzir efeito tipo-antidepressivo nos animais expostos ao teste de nado forçado. Além disso, também investigou-se o papel dos receptores AMPA, da via BDNF-TrkB e da mTOR sobre os efeitos do antagonismo NMDA e do bloqueio da nNOS no CPFMV-PL. O teste do campo aberto foi realizado para confirmar que os dados obtidos no teste do nado forçado não eram falso-positivos.

Experimento 1: Efeitos do bloqueio da via NMDA-nNOS-GCs no CPFMV-PL de animais submetidos ao teste do nado forçado ou ao teste do campo aberto

Experimento 1.1. Efeitos do bloqueio da via NMDA-nNOS-GCs no CPFMV-PL de animais submetidos ao teste do nado forçado:

Animais experimentalmente ingênuos, com cânulas cirurgicamente implantadas no CPFMV-PL, foram expostos ao pré-teste e ao teste do nado forçado. Cinco minutos antes do teste, os animais receberam a administração de NPA (0,01

nmol (Zhang *et al.*, 1997; Resstel *et al.*, 2006; Resstel *et al.*, 2008)), c-PTIO (1,0 nmol (Aguiar *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2007; Resstel *et al.*, 2008)), ODQ (1,0 nmol (Aguiar *et al.*, 2006)) ou respectivos veículos no CPFMV-PL. Um grupo independente de animais submetido aos mesmos procedimentos receberam as drogas acima, nas mesmas doses no CPFMV-PL, imediatamente após o pré-teste.

Experimento 1.2. Efeitos do bloqueio da via NMDA-nNOS-GCs no CPFMV-PL de animais submetidos ao teste do campo aberto:

Grupos independentes de animais receberam NPA, c-PTIO, ODQ ou respectivos veículos no CPFMV-PL, conforme descrito anteriormente, cinco minutos antes de serem expostos ao teste do campo aberto. As doses dos tratamentos utilizados no campo aberto foram as mesmas doses capazes de alterar de forma estatisticamente significativa o tempo de imobilidade dos animais no nado forçado.

Experimento 2: Efeitos do bloqueio dos receptores AMPA, no CPFMV-PL, sobre os efeitos da administração de LY 235959 ou NPA em animais submetidos ao teste do nado forçado:

Animais experimentalmente ingênuos, com cânulas cirurgicamente implantadas no CPFMV-PL, foram expostos ao pré-teste e ao teste do nado forçado. Dez minutos antes do teste, os animais receberam a administração de NBQX (4 nmol/0,2µL) ou respectivos veículos no CPFMV-PL. Após 5 minutos da primeira injeção, os animais receberam a administração de doses efetivas de LY 235959 (10 nmol/0,2µL), NPA (0,01 nmol/0,2µL) ou respectivos veículos no CPFMV-PL. Os animais foram expostos ao teste do nado forçado 5 minutos após a segunda administração de drogas.

Experimento 3: Efeitos do bloqueio dos receptores Trk ou do bloqueio da mTOR, no CPFMV-PL, sobre os efeitos da administração de BDNF em animais submetidos ao teste do nado forçado:

Animais experimentalmente ingênuos, com cânulas cirurgicamente implantadas no CPFMV-PL, foram expostos ao pré-teste e ao teste do nado forçado. Quarenta minutos antes do teste os animais receberam a administração de Rapamicina (0,2 nmol/ 0,2µL), K252a (10 pmol/0,2µL) ou respectivos veículos no CPFMV-PL. Após 10 minutos da primeira injeção, os animais receberam a administração de BDNF (0,2 nmol/0,2µL) ou respectivos veículos no CPFMV-PL. Os animais foram expostos ao teste do nado forçado trinta minutos após a segunda administração de drogas.

Experimento 4: Efeitos do bloqueio dos receptores Trk ou do bloqueio da mTOR, no CPFMV-PL, sobre os efeitos da administração de LY 235959 ou NPA em animais submetidos ao teste do nado forçado:

Animais experimentalmente ingênuos, com cânulas cirurgicamente implantadas no CPFMV-PL, foram expostos ao pré-teste e ao teste do nado forçado. Dez minutos antes do teste, os animais receberam a administração de K252a (10 pmol/0,2µL) ou veículo no CPFMV-PL. Após 5 minutos da primeira injeção, os animais receberam a administração de doses efetivas de LY 235959, NPA ou respectivos veículos no CPFMV-PL. Os animais foram expostos ao teste do nado forçado 5 minutos após a segunda administração de drogas.

Seguindo o mesmo protocolo, dez minutos antes do teste, um grupo independente de animais recebeu a administração de Rapamicina (0,2 nmol/0,2µL)

ou veículo no CPFMV-PL. Após 5 minutos da primeira injeção, os animais receberam a administração de doses efetivas de LY 235959, NPA ou respectivos veículos no CPFMV-PL. Os animais foram expostos ao teste do nado forçado 5 minutos após a segunda administração de drogas.

4.4.2. Experimentos com injeção sistêmica de drogas

Neste experimento buscou-se confirmar os efeitos do tratamento sistêmico com antagonista NMDA, ketamina, ou inibidor da NOS, 7-NI ou L-NAME, em animais submetidos ao estresse de nado forçado. A partir desses experimentos determinou-se as doses efetivas dessas drogas para os experimentos subsequentes. Também investigamos o papel do bloqueio dos receptores Trk ou da mTOR, no CPFMV-PL, sobre os efeitos da ketamina e do 7-NI.

Experimento 5: Efeitos do tratamento sistêmico com ketamina ou 7-NI em animais submetidos ao nado forçado ou campo aberto:

Experimento 5.1: Efeitos do tratamento com ketamina ou com inibidores da NOS sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado:

Animais experimentalmente ingênuos foram expostos ao pré-teste e ao teste do nado forçado. Uma hora antes do teste, grupos independentes de animais receberam injeção i.p. de ketamina (3, 10 ou 30 mg/Kg) ou L-NAME (3, 10 ou 30 mg/Kg).

Outros dois grupos independentes foram realizados a fim de se testar o efeito do 7-NI no nado forçado, a saber:

- tratamento sistêmico repetido (0, 5 e 23h após o pré-teste) com 7-NI (30 ou 45 mg/Kg) diluído em PEG 50%:
- tratamento sistêmico agudo com 7-NI (30 mg/Kg), diluído em PEG 50%, uma hora antes do teste.

Experimento 5.2: *Efeitos do tratamento com ketamina ou com inibidores da NOS sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do campo aberto:*

Grupos independentes de animais receberam doses efetivas de Ketamina, 7-NI ou respectivos veículos via i.p., conforme descrito anteriormente, uma hora antes de serem expostos ao teste do campo aberto. As doses dos tratamentos utilizados no campo aberto foram as mesmas doses capazes de alterar de forma estatisticamente significativa o tempo de imobilidade dos animais no nado forçado.

Experimento 5.3: *Efeitos do bloqueio dos receptores Trk ou da mTOR, no CPFMV-PL, sobre tratamento sistêmico com ketamina ou 7-NI sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado:*

Animais experimentalmente ingênuos, com cânulas cirurgicamente implantadas no CPFMV-PL, foram expostos ao pré-teste e ao teste do nado forçado. Os animais receberam a administração de K252a (10 pmol/0,2µL), Rapamicina (0,2 nmol/0,2µL) ou veículo no CPFMV-PL. Após 5 minutos da primeira injeção, os animais receberam a administração via i.p. de ketamina (10 mg/Kg), 7-NI (30 mg/Kg) ou veículo, e após uma hora foram submetidos ao teste do nado forçado.

4.4.3. Experimentos com análise da expressão TrkB e mTOR

Neste experimento buscou-se elucidar se a exposição ao estresse de nado forçado ou o tratamento com antagonista NMDA, ketamina, ou inibidor da nNOS, 7-NI, interferem na atividade da via BDNF-TrkB-mTOR no CPFM.

Experimento 6: *Efeitos do tratamento com ketamina ou com inibidores da NOS sobre a expressão de TrkB ou mTOR:*

Animais experimentalmente ingênuos foram expostos ao pré-teste do nado forçado. Vinte e três horas após o pré-teste grupos independentes de animais receberam injeção i.p. de veículo, ketamina (10 mg/Kg) ou 7-NI (30 mg/Kg). Uma hora após os tratamentos, os animais foram sacrificados, os encéfalos removidos e as amostras de CPFM coletadas por punch. Um grupo independente de animais ingênuos ao estresse e aos tratamentos foi sacrificado, os encéfalos removidos e as amostras de CPFM coletadas por punch.

4.5. Análise Estatística

Os resultados dos testes utilizando o modelo de nado forçado e o campo aberto com uma única administração de drogas foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

Os resultados dos testes utilizando o modelo de nado forçado com duas administrações de drogas foram analisados ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett. Posteriormente, foi realizada análise por ANOVA de duas vias, para determinar a existência de interação entre tratamentos, sendo os fatores divididos em primeira administração e segunda administração. São apresentados apenas os dados

estatísticos dos grupos analisados por Anova de duas vias onde foi observada a interação dos tratamentos.

Em todas as análises, resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. Resultados

Localização do sítio de injeção:

Na figura 1 apresentam-se os diagramas representativos dos locais de injeção no CPFMv-PL dos animais submetidos aos experimentos, baseados nas secções coronais adjacentes modificadas do Atlas de Paxinos & Watson, 1998.

Figura 1. (a) Representação da localização dos sítios de administração dos animais submetidos aos experimentos com injeção de drogas no CPFMv-PL. **(b)** Fotomicrografia representativa do sítio de administração de drogas no CPFMv-PL.

Experimentos com injeção central de drogas:

Experimento 1: Efeitos do bloqueio da via NMDA-nNOS-GCs no CPFMV-PL de animais submetidos ao teste do nado forçado ou ao teste do campo aberto

Experimento 1.1: Efeitos do bloqueio da via NMDA-nNOS-GCs no CPFMV-PL de animais submetidos ao nado forçado:

A administração de NPA (0,01 nmol/0.2μL), ODQ (1,0 nmol/0.2μL) e c-PTIO (1,0 nmol/0.2μL) no PL, 5 minutos antes do teste, foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade dos animais ($F_{(3,29)} = 10,47$; $p < 0,05$; * $p < 0,05$, Dunnett) (Figura 2).

A administração de NPA (0,01 nmol/0.2μL), c-PTIO (1,0 nmol/0.2μL) ou ODQ (1,0 nmol/0.2μL), logo após o pré-teste do nado forçado, também reduziu o tempo de imobilidade dos animais ($F_{(3,26)} = 8,350$, * $p < 0,05$, Dunnett) (Figura 3).

Figura 2. Efeito da administração de inibidor da óxido nítrico sintase (NPA 0,01 nmol/0.2µL), inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ 1,0 nmol/0.2µL) e sequestrador extracelular de óxido nítrico (c-PTIO 1,0 nmol/0.2µL), intra PL, 5 minutos antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Veículo $n = 11$; NPA $n = 7$, ODQ $n = 5$ e c-PTIO $n = 7$.

Figura 3. Efeito da administração de inibidor da óxido nítrico sintase (NPA 0,01 nmol/0.2µL), inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ 1,0 nmol/0.2µL) e sequestrador extracelular de óxido nítrico (c-PTIO 1,0 nmol/0.2µL), intra PL, imediatamente após o pré-teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. *p < 0,05 (Anova seguida de Dunnett). Veículo n = 10 ; NPA n = 6, c-PTIO n = 8 e ODQ n = 5.

Experimento 1.2: *Efeitos do bloqueio da via NMDA-nNOS-GCs no CPFMv-PL de animais submetidos ao campo aberto:*

No teste do campo aberto, a administração de NPA (0,01 nmol/0.2µL) e c-PTIO (1,0 nmol/0.2µL), 5 min antes do teste, reduziu o número de cruzamentos totais dos animais, porém no tratamento com ODQ não houve alteração da atividade motora em relação ao grupo controle ($F_{(3,18)} = 5,262$, $*p < 0,05$, Dunnett) (Figura 4).

Figura 4. Efeito da administração de inibidor da óxido nítrico sintase (NPA 0,01 nmol/0.2µL), inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ 1,0 nmol/0.2µL) e sequestrador extracelular de óxido nítrico (c-PTIO 1,0 nmol/0.2µL), intra PL, 5 minutos antes do teste, sobre a número de cruzamentos totais de ratos expostos ao campo aberto. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Veículo $n = 8$; NPA $n = 4$, ODQ $n = 4$ e c-PTIO $n = 6$.

Experimento 2: Efeitos do bloqueio dos receptores AMPA, no CPFMv-PL, sobre os efeitos da administração de LY 235959 ou NPA em animais submetidos ao nado forçado:

A administração de LY 235959 (10 nmol/0,2µL) ou NPA (0,01 nmol/0,2µL) reduziram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Anova de uma via: $F_{(5,38)} = 17,34$; * $p < 0,05$; Dunnett). Entretanto, o pré-tratamento com NBQX não alterou significativamente o efeito comportamental induzido pelo tratamento com NPA. O pré-tratamento com NBQX (4 nmol/0,2µL) não induziu nenhuma alteração per se, mas foi capaz de bloquear os efeitos induzidos pelo LY 235959 (Anova de duas vias: primeiro tratamento $F_{(1,38)} = 8,234$, $p < 0,05$; segundo tratamento $F_{(2,38)} = 42,80$, $p < 0,05$; interação $F_{(2,38)} = 3,504$; # $p < 0,05$) (Figura 5).

Figura 5. Efeito da administração de antagonista dos receptores NMDA (LY 235959 - 10 nmol/0.2µL) ou da administração de inibidor da óxido nítrico sintase (NPA - 0,01 nmol/0.2µL), intra-PL, em animais pré-tratados com antagonista de receptores AMPA (NBQX - 4 nmol/0,2µL). Todas as administrações foram intra PL, sendo o NBQX injetado 5 minutos antes do LY ou NPA. O tempo de imobilidade dos ratos expostos ao nado forçado foi analisado 5 minutos após a administração de LY ou NPA. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). #Interação entre os tratamentos (ANOVA de duas vias). Veículo + Veículo $n = 10$, Veículo + LY $n = 6$, Veículo + NPA $n = 5$, NBQX + Veículo $n = 10$, NBQX + LY $n = 5$ e NBQX + NPA $n = 8$.

Experimento 3: Efeitos bloqueio dos receptores Trk ou do bloqueio da mTOR, no CPFMv-PL, sobre os efeitos da administração de BDNF em animais submetidos ao teste do nado forçado:

A administração de BDNF (0,1 nmol/0,2µL) reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (Anova de uma via: $F_{(5,22)} = 4,777$; * $p < 0,05$; Dunnett). O pré-tratamento com antagonista dos receptores Trk (K252a - 10 pmol/0,2µL) não induziu nenhuma alteração per se, mas foi capaz de bloquear os efeitos induzidos pelo BDNF. Da mesma forma, o pré-tratamento com bloqueador da mTOR (Rapamicina - 4 nmol/0,2µL) não induziu nenhuma alteração per se, mas foi capaz de bloquear os efeitos induzidos pelo BDNF (Anova de duas vias: primeiro tratamento $F_{(2,23)} = 2,139$, $p > 0,05$; segundo tratamento $F_{(1,23)} = 0,4649$, $p > 0,05$; interação $F_{(2,23)} = 3,569$; # $p < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Efeito da administração de BDNF (0,2 nmol/0,2µL), isoladamente, ou em associação com antagonista dos receptores Trk (K252a – 10 pmol/0,2µL) ou inibidor da mTOR (Rapamicina - 0,2 nmol/0,2µL) em animais submetidos ao TNF. O tempo de imobilidade dos ratos expostos ao nado forçado foi analisado 5 minutos após a administração de BDNF. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). #Interação entre os tratamentos (ANOVA de duas vias). Veículo + Veículo $n = 5$, Veículo + BDNF $n = 5$, K252a + Veículo $n = 4$, Rapamicina + Veículo $n = 4$, K252a + BDNF $n = 5$ e Rapamicina + BDNF $n = 5$.

Experimento 4: Efeitos do bloqueio dos receptores Trk ou do bloqueio da mTOR, no CPFMv-PL, sobre os efeitos da administração de LY 235959 ou NPA em animais submetidos ao teste do nado forçado:

Bloqueio dos receptores Trk:

A administração de LY 235959 (10 nmol/0,2µL) ou NPA (0,01 nmol/0,2µL) reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. O pré-tratamento com K252a (10 pmol/0,2µL) não induziu nenhuma alteração per se, como também não alterou os efeitos induzidos pelo LY 235959 ($F_{(3,19)} = 9,241$; $*p < 0,05$; Dunnett) (Figura 7). O pré-tratamento com K252a também não alterou a redução do tempo de imobilidade induzida pelo NPA ($F_{(3,18)} = 11,35$; $*p < 0,05$; Dunnett) (Figura 8).

Bloqueio da mTOR:

A administração de LY 235959 (10 nmol/0,2µL) ou NPA (0,01 nmol/0,2µL) reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. O pré-tratamento com Rapamicina (0,2 nmol/0,2µL) não induziu nenhuma alteração per se, mas foi capaz de bloquear os efeitos induzidos pelo LY 235959 (Anova de uma via $F_{(3,21)} = 3,083$; $*p < 0,05$; Dunnett - Anova de duas vias: primeiro tratamento $F_{(1,21)} = 0,6951$, $p < 0,05$; segundo tratamento $F_{(1,21)} = 3,006$, $p < 0,05$; interação $F_{(1,21)} = 5,291$; $*p < 0,05$) (Figura 9). Porém, pré-tratamento com Rapamicina não alterou a redução do tempo de imobilidade induzida pelo NPA ($F_{(3,22)} = 5,310$; $*p < 0,05$; Dunnett) (Figura 10).

Figura 7. Efeito da administração de antagonista dos receptores NMDA (LY 235959 - 10 nmol/0.2µL) em animais pré-tratados com antagonista dos receptores Trk (K252a - 10 pmol/0,2µL) no PL. O tempo de imobilidade dos ratos expostos ao nado forçado foi analisado 5 minutos após a administração de LY. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Veículo + Veículo $n = 6$, Veículo + LY $n = 6$, K252a + Veículo $n = 5$ e K252a + LY $n = 6$.

Figura 8. Efeito da administração de inibidor da nNOS (NPA – 0,01 nmol/0.2µL) em animais pré-tratados com antagonistas dos receptores Trk (K252a – 0,01 nmol/0,2µL) no PL. O tempo de imobilidade dos ratos expostos ao nado forçado foi analisado 5 minutos após a administração de NPA. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Veículo + Veículo $n = 6$, Veículo + NPA $n = 5$, Rapamicina + Veículo $n = 5$ e Rapamicina + NPA $n = 6$.

Figura 9. Efeito da administração de antagonista dos receptores NMDA (LY 235959 - 10 nmol/0.2µL) em animais pré-tratados com inibidor da mTOR (Rapamicina – 0,2 nmol/0,2µL) no PL. Todas as administrações foram intra PL, sendo a Rapamicina injetada 5 minutos antes do LY 235959. O tempo de imobilidade dos ratos expostos ao nado forçado foi analisado 5 minutos após a administração de LY. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). #Interação entre os tratamentos (ANOVA de duas vias). Veículo + Veículo $n = 5$, Veículo + LY $n = 7$, Rapamicina + Veículo $n = 6$ e Rapamicina + LY $n = 7$.

Figura 10. Efeito do inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (NPA – 0,01 nmol/0,2µL) em animais pré-tratados com inibidor da mTOR (Rapamicina – 0,2 nmol/0,2µL) no PL. Todas as administrações foram intra PL, sendo a Rapamicina injetada 5 minutos antes do NPA. O tempo de imobilidade dos ratos expostos ao nado forçado foi analisado 5 minutos após a administração de LY. *p < 0,05 (Anova seguida de Dunnett). Veículo + Veículo n = 7, Veículo + LY n = 6, Rapamicina + Veículo n = 6 e Rapamicina + LY n = 7.

Experimentos com injeção sistêmica de drogas:

Experimento 5: Efeitos do tratamento sistêmico com ketamina ou 7-NI em animais submetidos ao nado forçado ou campo aberto:

Experimento 5.1: Efeitos do tratamento com ketamina ou com inibidores da NOS sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado:

A administração aguda de Ketamina, uma hora antes do teste, foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade dos animais na dose de 10mg/kg ($F_{(4,25)} = 9,912$; $*p < 0,05$, Dunnett) (Figura 11).

A administração aguda de L-NAME, uma hora antes do teste, foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais de forma estatisticamente significativa na dose de 10mg/kg ($F_{(4,22)} = 5,571$; $*p < 0,05$, Dunnett) (Figura 12).

A administração repetida (0h, 5h e 23h após o pré-teste) de 7-NI, nas doses 30 e 45 mg/Kg (diluído com polietilenoglicol 400 a 50%), não foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais de forma estatisticamente significativa. O grupo controle representa os animais tratados com o veículo diluente de 7-NI (solução de polietilenoglicol 400 a 50%) ($F_{(4,31)} = 2,874$, $*p < 0,05$, Dunnett) (Figura 13). Porém, quando analisados separadamente o grupo tratado com 7-NI na dose de 30 mg/kg com o grupo salina, observa-se que existe uma diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos ($t_{(19)} = 2,377$; $\#p < 0,05$, Teste t de Student) (Figura 13). Devido a essa observação foi decidido fazer experimentos adicionais para se analisar os

efeitos do 7-NI diluído com polietilenoglicol 400 a 50%, em uma única administração, em animais submetidos ao nado forçado.

A administração aguda de 7-NI, na dose 30 mg/Kg (diluído com polietilenoglicol 400 a 50%), uma hora antes do teste, foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais de forma estatisticamente significativa ($F_{(2,12)} = 7,175$; $*p < 0,05$, Dunnett) (Figura 14).

Em todos os experimentos acima, a imipramina (15 mg/kg), um antidepressivo tricíclico, foi utilizada como controle positivo, sendo administrada 0, 5 e 23h após a sessão de pré-teste do TNF.

Figura 11. Efeito da administração sistêmica aguda de antagonista do receptores de glutamato do tipo NMDA (Ketamina, 3, 10 e 30 mg/Kg), imipramina (antidepressivo tricíclico, 15 mg/Kg), uma hora antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Salina $n=8$; Imi $n=4$; Ketamina 3 $n=5$; Ketamina 10 $n=8$ e Ketamina 30 $n=5$.

Figura 12. Efeito da administração sistêmica aguda de inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME, 3, 10 e 30 mg/Kg), imipramina (antidepressivo tricíclico, 15 mg/Kg), uma hora antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Salina $n=5$; Imi $n= 4$; L-NAME 3 $n= 5$; L-NAME 10 $n= 4$ e L-NAME 30 $n= 5$.

Figura 13. Efeito da administração sistêmica repetida de inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (7-NI, 30 e 45 mg/Kg – diluído com polietilenoglicol 400 a 50%), imipramina (antidepressivo tricíclico, 15 mg/Kg) e controle (solução e polietilenoglicol a 50%) sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. *p < 0,05 (Anova seguida de Dunnett). #p < 0,05 (Teste t de Student) Salina n=11; Imi n= 6; 7-NI 30 n= 10; 7-NI 45 n= 6 e Ctrl n= 3.

Figura 14. Efeito da administração sistêmica aguda de inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (7-NI, 30 mg/Kg – diluído com polietilenoglicol 400 a 50%), imipramina (antidepressivo tricíclico, 15 mg/Kg) ou veículo, uma hora antes do teste, sobre o tempo de imobilidade de ratos expostos ao nado forçado. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Veículo $n = 5$; Imi $n = 3$, 7-NI $n = 5$.

Experimento 5.2: Efeitos do tratamento com ketamina ou com inibidores da NOS sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do campo aberto:

No teste do campo aberto, a administração de Ketamina (10 mg/kg) ou 7-NI (30 mg/kg), uma hora antes do teste, não alterou de forma estatisticamente significativa o número de cruzamentos totais dos animais. ($F_{(2,13)} = 0,2772$, $p < 0,05$, Dunnett) (Figura 15).

Figura 15. Efeito da administração de antagonista NMDA (Ketamina 10 mg/Kg) ou inibidor seletivo da nNOS (7-NI 30 mg/Kg), via i.p., uma hora antes do teste, sobre o número de cruzamentos totais de ratos expostos ao campo aberto. $p > 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Veículo $n = 5$; Ketamina $n = 6$ e 7-NI $n = 5$

Experimento 5.3: Efeitos do bloqueio dos receptores Trk ou da mTOR, no CPFMv-PL, sobre tratamento sistêmico com ketamina ou 7-NI sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado:

A administração via i.p. de ketamina (10 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. O pré-tratamento com antagonista dos receptores Trk (K252a - 10 pmol/0,2μL) ou com inibidor da mTOR (Rapamicina 0,2 nmol/0,2μL) não induziram nenhuma alteração per se, tal como não foram capazes de bloquear os efeitos induzidos pela ketamina ($F_{(5,27)} = 10,17$; * $p < 0,05$; Dunnett) (Figura 16).

A administração via i.p. de 7-NI (30 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. O pré-tratamento com antagonista dos receptores Trk (K252a - 10 pmol/0,2μL) ou com inibidor da mTOR (Rapamicina 0,2 nmol/0,2μL) não induziram nenhuma alteração per se, tal como não foram capazes de bloquear os efeitos induzidos pelo 7-NI ($F_{(5,30)} = 13,40$; * $p < 0,05$; Dunnett) (Figura 17).

Figura 16. Efeito da administração sistêmica aguda de antagonista NMDA (Ketamina – 10 mg/kg) pré-tratados com inibidor da mTOR (Rapamicina – 0,2 nmol/0,2μL) ou de antagonista dos receptores Trk (K252a – 0,01 nmol/0,2μL) intra CPFMV-PL. As administrações intra CPFMV-PL foram realizadas 5 minutos antes do tratamento sistêmico. O tempo de imobilidade dos ratos expostos ao nado forçado foi analisado 60 minutos após a administração de ketamina. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett) comparado ao grupo Veículo + Veículo. Veículo + Veículo $n = 6$, K252a + Veículo $n = 6$, Rapamicina + Veículo $n = 6$, Veículo + ketamina $n = 5$, K252a + ketamina $n = 5$, Rapamicina + ketamina $n = 5$.

Figura 17. Efeito da administração sistêmica aguda de inibidor da nNOS (7-NI – 30 mg/kg) pré-tratados com inibidor da mTOR (Rapamicina – 0,2 nmol/0,2µL) ou de antagonista dos receptores Trk (K252a – 0,01 nmol/0,2µL) intra CPFMV-PL. As administrações intra CPFMV-PL foram realizadas 5 minutos antes do tratamento sistêmico. O tempo de imobilidade dos ratos expostos ao nado forçado foi analisado 60 minutos após a administração de 7-NI. * $p < 0,05$ (Anova seguida de Dunnett) comparado ao grupo Veículo + Veículo. Veículo + Veículo $n = 5$, K252a + Veículo $n = 6$, Rapamicina + Veículo $n = 6$, Veículo + 7-NI $n = 8$, K252a + 7-NI $n = 6$, Rapamicina + 7-NI $n = 5$.

Experimentos com análise da expressão, TrkB e mTOR:

Experimento 6: *Efeitos do tratamento com ketamina ou com inibidores da NOS sobre a expressão de mTOR ou TrkB de animais submetidos ao pré-teste do nado forçado:*

A administração via i.p. de ketamina (10 mg/kg), 7-NI (30 mg/kg), ou veículo, não alteraram a expressão de proteína total ou fosforilada do receptor TrkB ($F_{(3,26)} = 0,1360$; $p > 0,05$; Dunnett) (Figura 18). Os mesmos tratamentos também não alteraram a expressão de proteína total ou fosforilada da mTOR ($F_{(3,16)} = 0,3526$; $p > 0,05$; Dunnett) (Figura 19).

Figura 18. Efeito da administração de veículo, antagonista NMDA (Ketamina 10 mg/Kg) ou inibidor seletivo da nNOS (7-NI 30 mg/Kg), via i.p., sobre a expressão de TrkB fosforilada normalizada pela expressão de TrkB total. As amostras do CPFM foram coletadas 1 hora após a administração das drogas. $p > 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Naive $n = 8$, Veículo $n = 8$; Ketamina $n = 8$ e 7-NI $n = 6$.

Figura 19. Efeito da administração de veículo, antagonista NMDA (Ketamina 10 mg/Kg) ou inibidor seletivo da nNOS (7-NI 30 mg/Kg), via i.p., sobre a expressão de mTOR fosforilada normalizada pela expressão de mTOR total. As amostras do CPFM foram coletadas 1 hora após a administração das drogas. $p > 0,05$ (Anova seguida de Dunnett). Naive $n = 5$, Veículo $n = 5$; Ketamina $n = 5$ e 7-NI $n = 5$.

6. Discussão

Experimentos com injeção central de drogas

Os resultados demonstram que a administração de antagonista de receptores NMDA (LY 235959), de inibidor da síntese de NO (NPA) ou de sequestrador extracelular de NO (c-PTIO), bem como a inibição da GCs (principal alvo do NO) pelo ODQ, no CPFMV-PL, cinco minutos antes da sessão teste, foi capaz de produzir efeito do tipo-antidepressivo nos animais expostos ao nado forçado. Da mesma forma, quando administrado NPA ou c-PTIO imediatamente após o pré-teste no nado forçado, foram observados efeitos do tipo-antidepressivo, mas o mesmo não foi visto com a administração de ODQ. Portanto, esses dados sustentam a hipótese de que o glutamato, por meio de receptores NMDA, e o NO presentes no CPFMV-PL modulam as respostas comportamentais induzidas pela exposição ao estresse de nado forçado, tanto após o pré-teste, quanto durante o teste.

Os resultados obtidos com o teste do campo aberto confirmam que o efeito da administração de NPA, c-PTIO ou ODQ, no CPFMV-PL, nas mesmas doses que foram eficazes no teste do nado forçado, não ocorreram devido a efeitos psicoestimulantes, uma vez que não houve aumento no número de cruzamentos totais dos animais tratados em relação ao grupo controle. Interessantemente, o animais tratados com NPA e c-PTIO apresentaram redução do número de cruzamentos totais, sendo que este é um efeito comum a inibidores da NOS já demonstrado em trabalhos anteriores descritos na literatura (Harkin *et al.*, 2003; Volke *et al.*, 2003; Gigliucci *et al.*, 2010) e que se mostra dissociado dos efeitos comportamentais, visto que não leva a um aumento do tempo de imobilidade dos animais tratados com essas drogas no CPFMV-PL e expostos ao teste do nado forçado. A administração sistêmica de outros

inibidores da NOS, como 7-NI e L-NNA, L-NAME e L-NMMA, também apresentou efeitos do tipo antidepressivo no TNF que são independentes de alterações motoras, de tal modo confirmando que os inibidores da NOS não agem como psicoestimulantes (Harkin *et al.*, 1999; Yildiz *et al.*, 2000).

Os dados obtidos até aqui sugerem que durante as sessões pré-teste e teste de nado forçado ocorre um aumento na liberação de glutamato no CPFMV que, ao ativar receptores NMDA, levaria à formação de NO. Esse, por sua vez, se difundiria para células circunvizinhas (uma vez que o c-PTIO, que é um sequestrador extracelular de NO, também induziu efeito antidepressivo) para atuar sobre alvos específicos, como a sGC (apenas durante o teste), e assim desencadear eventos intracelulares que culminariam com o desenvolvimento de alterações comportamentais.

Nos resultados aqui apresentados, o aumento de NO no CPFMV-PL poderia alterar o funcionamento dessa estrutura e, assim, prejudicaria a manutenção da resposta comportamental adequada ao evento estressante. O NO pode interagir com resíduos de diferentes proteínas, promovendo s-nitrosilação, e assim interferir no funcionamento delas (Calabrese *et al.*, 2007); sendo que ao reagir com superóxidos ele leva a formação de peroxinitrito, uma substância capaz de danificar o DNA, proteínas e lipídios (Hara *et al.*, 2007). A liberação de glutamato também pode ser aumentada pelo NO (Segovia *et al.*, 1994; Guix *et al.*, 2005; Roenker *et al.*, 2012). A infusão de doador de NO, o SIN-1, no hipocampo e estriado de animais acordados, mostrou ser capaz de aumentar a quantidade extracelular de glutamato, medido pelo método de perfusão *push-pull* (Segovia *et al.*, 1994). De modo similar, a administração sistêmica de nitroprussiato de sódio (NPS), outro doador de NO, foi capaz de aumentar a quantidade extracelular de glutamato no córtex pré-frontal, medido por

micro dialise retrograda (Roenker *et al.*, 2012). Tais achados corroboram a hipótese de que o NO pode estimular a neurotoxicidade por glutamato, sendo que dados *in vitro* mostram que a infusão de L-NA reduz a morte celular promovida por NMDA (agonista dos NMDAR) e NPS em cultura primária de neurônios corticais (Dawson *et al.*, 1991). Ainda há indícios de que o NO pode alterar o metabolismo de serotonina no córtex pré-frontal, uma vez que a administração sistêmica de L-NA reduz o "turnover" de serotonina nessa região (Karolewicz *et al.*, 2001). Assim, cruzando tais dados com os obtidos neste projeto é possível propor que a redução da produção de NO no CPFMV-PL dos animais expostos ao TNF auxiliaria na redução de glutamato liberado e no aumento da quantidade de serotonina liberada, dessa forma atenuando prejuízos funcionais e manifestação de alterações comportamentais correlatas.

Em humanos, há evidências de que a administração crônica de azul de metileno, um inibidor da NOS e da guanilato ciclase solúvel (Volke *et al.*, 1999), promove significativo efeito antidepressivo (Naylor *et al.*, 1987). Além disso, Jefferys e Funder (1996) também realizaram experimentos a fim de investigar o possível envolvimento do NO na depressão, onde demonstraram que a administração intraperitoneal de inibidor não seletivo das enzimas NOS, o L-NAME, induz efeito tipo-antidepressivo no modelo do nado forçado (Jefferys *et al.*, 1996). Estudos mais recentes reforçaram o papel do NO na depressão, onde através de modelos como o nado forçado e o estresse crônico variado foram corroborados os efeitos antidepressivos produzidos pela inibição da nNOS, através da injeção de 7-NI por via sistêmica aguda, repetida (7 dias) ou diretamente no hipocampo (Yildiz *et al.*, 2000; Joca *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Deste modo, os resultados discutidos até aqui reforçam a participação do sistema nitrérgico na neurobiologia da depressão, além de

serem os primeiros a demonstrarem que o bloqueio direto da produção de NO no CPFMV-PL é capaz de induzir efeito tipo antidepressivo.

Conforme apresentado na introdução do presente trabalho, os efeitos comportamentais dos antagonistas NMDAR dependem da ativação dos receptores AMPA (Maeng *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Koike *et al.*, 2011a). Atualmente é sugerido que o antagonismo dos receptores NMDA promoveria uma desinibição cortical da liberação de glutamato, que por sua vez promoveria a ativação dos receptores AMPA, uma vez que os receptores NMDA estariam bloqueados (Machado-Vieira *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012). Corroborando tal hipótese, diversos estudos têm mostrado que agonistas AMPA são capazes de produzir efeitos do tipo-antidepressivo (Alt *et al.*, 2006; Nations *et al.*, 2012; Burgdorf *et al.*, 2013).

Dessa forma, buscando aprofundar o conhecimento sobre as interações do sistema glutamatérgico e nitrérgico no CPFMV-PL, também foi avaliada a participação dos receptores AMPA sobre os efeitos comportamentais do antagonismo NMDA e do bloqueio da nNOS nessa estrutura. O pré-tratamento com antagonista AMPA (NBQX) foi capaz de bloquear os efeitos comportamentais induzido pelo antagonista NMDA, LY 235959, em animais expostos ao teste do nado forçado. Porém, sob as mesmas condições experimentais, o pré-tratamento com NBQX não foi capaz de bloquear o efeito tipo-antidepressivo induzido pelo NPA.

O efeito tipo-antidepressivo do LY 235959 já havia sido estudado anteriormente, onde foi demonstrado que a injeção dessa droga no CPFMV-PL induz efeitos do tipo antidepressivo em animais submetidos ao teste do nado forçado (Pereira *et al.*, 2015). Agora, nossos dados quanto aos efeitos do LY 235959 corroboram a hipótese de que o efeito comportamental do antagonismo NMDA em regiões corticais pode ser devido ao aumento na liberação de glutamato e ativação

dos receptores AMPA, visto que os efeitos do LY 235959 são inibidos pela administração de NBQX no CPFMV-PL.

No entanto, quando o tratamento com NBQX foi realizado antes da administração de NPA, o efeito tipo-antidepressivo do inibidor da nNOS não foi bloqueado. Inicialmente, era esperado que o NBQX bloqueasse o efeito tipo-antidepressivo do NPA, pois como a produção de NO é atrelada a ativação dos receptores NMDA, seria plausível assumir que o bloqueio de sua síntese também estivesse envolvido no mecanismo de desinibição de glutamato no córtex e consequente aumento da ativação dos receptores AMPA. Porém, dado o resultado obtido, o mecanismo sugerido acima parece não acontecer no CPFMV-PL. Assim sendo, podemos sugerir que os mecanismos pelos quais o antagonismo NMDA e a inibição da nNOS, no CPFMV-PL, promovem efeito antidepressivo podem ser dissociados. Esse resultado é contrário ao estudo de Zhang e colaboradores (2013), onde eles viram que os efeitos tipo-antidepressivo da ketamina envolveriam uma redução na atividade da NOS (total, endotelial e induzida) no hipocampo e que doses subefetivas de L-NAME potencializavam o efeito do antagonista NMDA no TNF (Zhang *et al.*, 2013). Vale destacar que o resultado aqui discutido não exclui a hipótese de que os efeitos dos antagonistas NMDA envolvem a redução da produção de NO, mas eles mostram a possibilidade de que as vias pelas quais os antagonistas NMDA e os inibidores da nNOS promovem seus efeitos tipo antidepressivo podem ser diferentes. Considerando essa dissociação, é importante destacar que embora a ativação dos NMDAR seja a via majoritária para ativação da nNOS e produção de NO, já foi demonstrado que a ativação da nNOS no SNC pode acontecer de forma independente de NMDAR. De fato, a ativação de receptores purinérgicos, mediada por ATP e pelos receptores do tipo P2X e P2Y, é capaz de promover a formação de

NO no SNC (Florenzano *et al.*, 2008). Em estudo recente, a administração sistêmica de isso-PPADS, um antagonista seletivo dos receptores P2X (P2XR), foi capaz de produzir efeito tipo-antidepressivo em camundongos expostos ao TNF e reduzir a expressão de nNOS no córtex desses animais (Pereira *et al.*, 2013). Nesse mesmo estudo também foi visto que a nNOS parece estar ancorada aos P2XR, pois foi observada a expressão de P2XR em amostras de córtex imunoprecipitadas para a nNOS (Pereira *et al.*, 2013). Outra forma de se induzir a ativação da via do NO pode ser através do sistema colinérgico. Achados recentes mostram que a administração de acetilcolina no CPFMV-PL pode promover a formação nitrito e nitrato, dois metabólitos da formação de NO (Fassini *et al.*, 2014). Além disso, no mesmo estudo, os efeitos taquicárdicos da administração de acetilcolina na mesma região ocorrem via os receptores muscarínicos do tipo 3 e foram bloqueados pelo sequestrador extracelular de NO, c-PTIO, e pelo inibidor da sGC, ODQ (Fassini *et al.*, 2014). Dessa forma, como a produção de NO no córtex pré-frontal pode não depender somente de NMDAR, é possível que os efeitos tipo antidepressivo da inibição da via do NO nessa estrutura possam depender da interação com outros sistemas de neurotransmissão. Portanto, permanece evidenciado o importante papel do sistema nitrérgico do CPFMV-PL como alvo das alterações promovidas pelo estresse e que resultam em prejuízo de respostas comportamentais.

A hipótese inicial deste trabalho era de que o estresse promoveria liberação de glutamato e ativação de receptores NMDA, com consequente aumento da produção de NO, no CPFMV-PL e essa via prejudicaria a sinalização local mediada por BDNF-TrkB e mTOR, favorecendo o estabelecimento de alterações comportamentais do estresse. Apesar de nossos resultados indicarem que no CPFV-PL o efeito tipo antidepressivo do antagonismo NMDA ou do bloqueio da formação de NO são

dissociados, eles não excluem a possibilidade de que ambos os sistemas interajam com sinalização via BDNF-TrkB e mTOR no CPFMV-PL, desse modo sustentando a continuidade dos estudos realizados.

Buscando elucidar os mecanismos pelos quais o bloqueio glutamatérgico ou nitrérgico do CPFMV-PL promovem seus efeitos comportamentais, o envolvimento da via BDNF-TrkB-mTOR na modulação das respostas comportamentais de animais submetidos ao teste do nado forçado foi investigado. Inicialmente, demonstramos que a administração de BDNF, no CPFMV-PL, 5 minutos antes do teste, foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais e o pré-tratamento, no mesmo local, com antagonista dos receptores Trk (K252a) ou com inibidor da mTOR (Rapamicina) foi capaz de bloquear a redução do tempo de imobilidade induzido pelo BDNF.

Avaliando os dados acima, os resultados aqui apresentados corroboram o envolvimento da sinalização via BDNF-TrkB e mTOR, do CPFMV-PL, na neurobiologia da depressão. O fato dos efeitos rápidos, em 5 min., do BDNF aqui representados serem bloqueados pelo K252a e pela rapamicina tornam os resultados ainda mais interessantes, pois o que se observa predominantemente na literatura é que a ativação da via BDNF-TrkB e mTOR estaria envolvida apenas em efeitos comportamentais de longo prazo de antagonistas NMDA (Autry *et al.*, 2011) ou quando era bloqueada 30 (Romano, 2014 - dissertação) ou 90 minutos antes da exposição dos animais aos testes comportamentais (Li *et al.*, 2010). As ações do BDNF são conhecidas principalmente pela modulação de mecanismos plásticos e de manutenção da sobrevivência neuronal, tal como apresentado na introdução deste trabalho. Os efeitos em curto prazo aqui relatados indicam que o BDNF poderia alterar o funcionamento neuronal de forma rápida (revisado por Rose *et al.*, 2004). De fato, estudos *in vitro* de eletrofisiologia demonstraram que o BDNF é capaz de promover o disparo neuronal

através do receptor TrkB e de forma dependente de canais de sódio em neurônios do córtex, hipocampo e cerebelo. Ainda através desse mecanismo o BDNF é capaz de modular a potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo, um importante evento para a formação de memória (Kafitz *et al.*, 1999; Kafitz *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2004). Uma observação importante é que o efeito do BDNF sobre a LTP foi equivalente ao do glutamato que é conhecido como o principal mediador de LTP (Kafitz *et al.*, 1999; Kafitz *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2004). Em neurônios, astrócitos e células da glia, foi visto que a administração de BDNF é capaz de gerar uma mobilização rápida de cálcio intracelular pelo retículo endoplasmático através da ativação de uma isoforma truncada do receptor TrkB, com consequente ativação de PLC1 γ e IP3 (Mizoguchi *et al.*, 2011). Além de poder induzir a ativação neuronal o BDNF também pode promover a liberação de serotonina no SNC, como já demonstrado por estudos *in vivo* com a infusão de BDNF diretamente na *substancia nigra* (Altar *et al.*, 1994). Investigações *in vitro* mostram que o BDNF leva a liberação de serotonina de forma dependente dos receptores Trk em cortes de estriado (Goggi *et al.*, 2002). Assim, é possível sugerir que o efeito antidepressivo rápido observado com a administração de BDNF no PL envolva a modulação da neurotransmissão serotoninérgica local. De fato, existem trabalhos demonstrando que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica no PL promove efeito antidepressivo (Hamani *et al.*, 2010; Guerini *et al.*, 2014 – submetido para publicação). Portanto, nossos resultados reforçam o papel da via BDNF-TrkB-mTOR do CPFMV-PL sobre o controle da resposta emocional ao estresse. Mostramos ainda que a participação da via nesse tipo de resposta pode ocorrer de forma rápida, e com base na literatura supracitada é possível que essa ação rápida envolva os mecanismos de ativação de neurônios ou liberação de serotonina.

A interação entre os receptores NMDA, a enzima nNOS e a via BDNF-TrkB-mTOR no CPFMV-PL também foi estudada. Os resultados obtidos mostram que o bloqueio dos receptores Trk pelo K252a, na mesma dose capaz de bloquear o efeito tipo antidepressivo do BDNF, não é capaz de alterar os efeitos tipo antidepressivo da administração de antagonista NMDA ou de inibidor da nNOS, no CPFMV-PL. Porém, a administração de rapamicina (inibidor da mTOR), na mesma dose capaz de bloquear o efeito tipo antidepressivo do BDNF, previamente a administração de LY 235959, foi capaz de bloquear o efeito tipo-antidepressivo do antagonista NMDA em animais expostos ao teste do nado forçado. Entretanto, os efeitos comportamentais da administração de NPA, no CPFMV-PL, não foram bloqueados pelo tratamento prévio com rapamicina.

Ao avaliar tal resultado podemos levantar considerações interessantes, sendo elas: (1) os efeitos comportamentais rápidos do bloqueio NMDA podem depender da interação com o componente intracelular (mTOR) e não com o componente extracelular (receptor Trk), ou seja, é possível que os efeitos do LY 235959 sejam independentes da ativação de TrkB (este mecanismo será melhor discutido mais a frente); (2) os dados reforçam que os efeitos comportamentais da inibição do NO, no CPFMV-PL, parecem ser independentes da interação com os receptores AMPA ou com a via BDNF-TrkB-mTOR. Essas observações reforçam a suposição de que os efeitos comportamentais do antagonismo NMDA e da inibição da nNOS, no CPFMV-PL são dissociados, pois o LY 235959 teve sua ação bloqueada pelo NBQX e pela rapamicina, enquanto os efeitos do NPA não foram afetados por essas drogas.

Conforme apresentado na introdução deste trabalho, já foi previamente demonstrado que o efeito tipo-antidepressivo de antagonistas NMDA seriam dependentes da ativação da mTOR no CPFMV (Li *et al.*, 2010; Duman *et al.*, 2014).

Nossos dados onde o efeito do LY 235959 no nado forçado foi abolido na presença de rapamicina vão no mesmo sentido da literatura (Li *et al.*, 2010; Duman *et al.*, 2014). Contudo, era esperado que o K252a na mesma dose em que bloqueou os efeitos do BDNF também bloqueasse os efeitos do LY 235959, uma vez que considerando um efeito em cascata, a ativação de TrkB levaria a ativar mTOR, ainda mais que a mTOR parece ser um ponto chave para os efeitos da via BDNF-TrkB (Costa-Mattioli *et al.*, 2013).

Para compreender melhor o porquê deste resultado intrigante é necessário descrever o mecanismo proposto para o qual os antagonistas NMDA promoveriam a ativação da mTOR e os mecanismos plásticos dependentes dela. É sugerido que o antagonismo NMDA resultaria em aumento da liberação de glutamato, pois os NMDAR de interneurônios gabaérgicos inibitórios também seriam bloqueados e esses interneurônios não seriam ativados, assim desinibindo os neurônios glutamatérgicos, principalmente no córtex (Browne *et al.*, 2013; Abdallah *et al.*, 2015). Consequentemente, haveria uma quantidade de glutamato sendo liberada que aumentaria a ativação dos receptores AMPA, visto que os NMDAR estão bloqueados (Browne *et al.*, 2013; Abdallah *et al.*, 2015). Experimentos *in vitro* demonstram que ativação dos receptores AMPA podem estimular a liberação de BDNF através de canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L (L-VDCC) (Browne *et al.*, 2013; Lepack *et al.*, 2014; Abdallah *et al.*, 2015). Nesse sentido, evidências recentes mostram que tanto a administração de um anticorpo anti-BDNF, no CPFMV, quanto a injeção sistêmica de dois inibidores dos L-VDCC, nifedipino e verapamil, foram capazes de bloquear os efeitos tipo antidepressivo da ketamina em ratos submetidos ao teste do nado forçado (Lepack *et al.*, 2014). Embora o presente trabalho seja o primeiro a avaliar o efeito direto do antagonismo TrkB sobre os efeitos de um

antagonista NMDA, vimos pelos dados descritos acima que existe uma interação dos efeitos comportamentais do bloqueio dos NMDAR com a via do BDNF e com a atividade da mTOR, de maneira relacionada a ativação dos receptores AMPA (Browne *et al.*, 2013; Costa-Mattioli *et al.*, 2013; Lepack *et al.*, 2014). Contudo, existem indícios de que os receptores AMPA podem levar a ativação de mTOR independentemente da via BDNF-TrkB. Em cultura de neurônios estriatais foi observado que os receptores AMPA, de modo dependente do influxo de cálcio promovido por esses receptores, estariam envolvidos em mecanismos de plasticidade neuronal e expressão gênica através da ativação das vias MEK/ERK e PI3K/AKT (Mao *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004a), sendo que como mencionado na introdução deste trabalho essas duas vias são ativadas pelo receptor TrkB na promoção dos efeitos do BDNF (Nagahara *et al.*, 2011). Dessa forma, considerando que não obtivemos o bloqueio dos efeitos do LY 235959 pelo pré-tratamento com k252a, é plausível propor que em nossas condições os resultados obtidos se devem a uma ativação dos receptores AMPA e das vias MEK/ERK e PI3K/AKT, culminando no acionamento da mTOR. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

Em relação a ausência de interação entre o efeito tipo antidepressivo do inibidor da nNOS e a via BDNF-TrkB-mTOR, esse achado reforça o fato de que o efeito tipo antidepressivo advindo da inibição da nNOS são dissociados dos mesmos efeitos promovidos pelos antagonistas NMDA e, tal como discutido anteriormente, a ação do bloqueio da nNOS, no CPFMv-PL, sobre o comportamento pode estar mais relacionado a sua capacidade de modular a liberação de monoaminas, como a serotonina. Porém, a interação entre NO e BDNF não pode ser inteiramente descartada. Animais submetidos ao modelo do estresse crônico variado apresentaram aumento do comportamento tipo depressivo no TNF e redução da expressão de BDNF

no hipocampo, mas tais consequências foram prevenidas em animais tratados diariamente durante todo o experimento com o inibidor seletivo da nNOS, 3-bromo-7-NI, ou com o inibidor da sGC, ODQ (Yazir *et al.*, 2012). Nesse sentido, recentemente foi demonstrado que o efeito tipo antidepressivo da administração sistêmica da estatina sintética, atorvastatina, no teste de suspensão pela cauda é inibido pela administração de L-arginina (precursor de NO) e potencializado pela co-administração de 7-NI, azul de metileno ou ODQ, além de reduzir as quantidades de metabólitos do NO (nitrito e nitrato) e aumentar a expressão de BDNF no hipocampo desses animais (Ludka *et al.*, 2013). Na literatura não são encontrados trabalhos demonstrando uma interação similar às supracitadas, entre BDNF e NO em regiões corticais, ou seja, é possível que não tenhamos observado o bloqueio do efeito tipo antidepressivo do NPA pelo pré-tratamento com K252a ou rapamicina por, no CPFMV-PL, não ocorrer uma interação entre BDNF-TrkB e mTOR com o NO de maneira significativa para a modulação de respostas comportamentais.

Por fim, os dados discutidos até aqui corroboram que o CPFMV-PL tem um papel importante no controle de respostas comportamentais. Além do mais, vale ressaltar que este é o primeiro trabalho a demonstrar que os efeitos comportamentais da inibição da nNOS, no CPFMV-PL, podem ser promovidos por mecanismos independentes dos quais os antagonistas NMDA promovem seus efeitos na mesma região do SNC. Os efeitos rápidos em melhorar a resposta ao estresse de nado forçado da via BDNF-TrkB-mTOR, no CPFMV-PL, também são inéditos e expandem as informações disponíveis sobre o papel das neurotrofinas na neurobiologia da depressão.

Experimentos com injeção sistêmica de drogas

Paralelamente aos experimentos com injeção central de drogas foram executados protocolos experimentais com a administração sistêmica aguda (uma única injeção) de drogas. Através desses experimentos foi possível estabelecer as doses eficazes do antagonista NMDA, ketamina, e dos inibidores da NOS, L-NAME e 7-NI. Além disso, foi investigado se o bloqueio dos receptores TrkB ou da mTOR, no CPFMv-PL seria capaz de interferir na ação da administração sistêmica de ketamina ou 7-NI.

Nos grupos submetidos ao tratamento sistêmico, foi observado que tanto o tratamento com antagonista NMDA, ketamina (10 mg/Kg), bem como o tratamento com inibidor da NOS, L-NAME (10 mg/Kg) ou com inibidor preferencial da nNOS, 7-NI (30 mg/Kg) promoveram efeito tipo-antidepressivo agudamente. Através do teste do campo aberto demonstramos que as doses efetivas de ketamina (10 mg/Kg) e 7-NI (30 mg/Kg) não alteraram a atividade locomotora dos animais, tal como visto em outros trabalhos (Harkin *et al.*, 1999; Yildiz *et al.*, 2000; Autry *et al.*, 2011).

O resultado aqui descrito com a administração aguda via i.p. de ketamina corrobora dados já apresentados na literatura, onde é descrito que essa droga, em doses subanestésicas, promove efeito antidepressivo rápido, em menos de duas horas, tanto em modelos animais quanto em humanos deprimidos (Li *et al.*, 2010; Nanxin Li, 2011; Mathews *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012). Embora não tenha sido aqui investigado, já foi visto que os efeitos comportamentais da administração sistêmica aguda de ketamina pode durar por até 15 dias (Zarate *et al.*, 2012). Tais evidências incentivaram a realização de um grande número de pesquisas científicas com objetivo de compreender os mecanismos envolvidos nos efeitos dessa droga e,

com isso, identificar novos alvos moleculares envolvidos na neurobiologia da depressão (Machado-Vieira *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012).

Como já foi apresentado na introdução, os efeitos da ketamina dependem da atividade normal dos receptores AMPA e o uso de drogas que atuem ativando esse receptor tem demonstrado potencial para o uso como antidepressivos (Li *et al.*, 2001; Lindholm *et al.*, 2012; Browne *et al.*, 2013). O uso da ketamina em conjunto com outras drogas já utilizadas na clínica também está sendo explorado, dando-se destaque para um estudo pré-clínico que avaliou a associação entre ketamina e o lítio, um conhecido estabilizante do humor (Liu *et al.*, 2013; Duman *et al.*, 2014). A ação antidepressiva de uma dose sub-efetiva de ketamina foi potencializada e durou por até uma semana quando realizada a administração prévia de dose sub-efetiva de lítio (Liu *et al.*, 2013). Nesta investigação foi esclarecido que essa interação acontece através da ação do lítio em inibir a proteína quinase GSK3- β , pois essa proteína quinase tem um papel inibitório sobre a mTOR e, dessa forma, ao lítio bloqueá-la acontece uma facilitação dos efeitos da ketamina sobre a mTOR (Liu *et al.*, 2013). Todo esse conjunto de informações destaca a importância que a observação o efeito antidepressivo da ketamina tem para o desenvolvimento de novos fármacos com perfil farmacológico e terapêutico (rápido início de ação) diferentes dos antidepressivos convencionais.

Voltando a atenção para os inibidores da via do NO, os resultados obtidos com administração de L-NAME e de 7-NI evidenciam que essas drogas também são capazes de promover efeitos tipo-antidepressivo após uma única administração. Vale ressaltar que antidepressivos convencionais somente promovem efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado quando administrados repetidamente ou três vezes em 24h (Detke *et al.*, 1995; Cryan *et al.*, 2005; Gigliucci *et al.*, 2010). Assim, nossos dados sugerem que os inibidores da NOS poderiam ter um perfil de ação

rápida semelhante aos da ketamina, sendo capazes de promover seus efeitos após uma única administração.

Em relação aos grupos submetidos ao tratamento sistêmico com inibidor seletivo da isoforma neuronal da NOS (nNOS), o 7-NI, os resultados merecem algumas observações importantes. Primeiro, vimos que em nossas condições experimentais, ao contrário do que é encontrado na literatura (Joca *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2012), não conseguimos reproduzir os efeitos tipo-antidepressivo com o tratamento repetido, 0, 5 e 23 horas após o pré-teste do TNF, dessa droga, independentemente do solvente utilizado (DMSO ou polietilenoglicol 400). Foi visto que o tratamento repetido com 7-NI, na dose 30 mg/kg, quando comparado apenas ao grupo salina (excluindo-se os demais grupos realizados no mesmo experimento), foi capaz de produzir efeito tipo-antidepressivo, porém este resultado não se apresenta como conclusivo do efeito da droga. Dessa forma, experimentos adicionais buscando comparar o tratamento repetido (três vezes após o pré-teste) com o tratamento agudo de 7-NI (ambos diluídos com solução de PEG a 50%) demonstraram que apenas uma administração de droga, na dose de 30 mg/kg, é capaz de produzir efeito do tipo-antidepressivo enquanto o tratamento repetido se mostrou mais uma vez ineficaz. Uma possível explicação para tal diferença entre o tratamento repetido e o tratamento agudo se deve ao fato de que com o novo solvente (polietilenoglicol 400) a solubilidade do 7-NI é melhorada, assim quantidades maiores da droga podem ser absorvidas. Portanto, é plausível que, com a melhor absorção da droga, o tratamento repetido acabe resultando em doses elevadas de 7-NI, ao ponto de que se obtenha perda da especificidade e eficácia da droga. Tal característica é correspondente a curva dose-resposta em sino, um evento observado na literatura com outros inibidores da NOS (Harkin *et al.*, 1999; Karolewicz *et al.*, 2001). Já o tratamento agudo estaria,

então, levando a absorção da quantidade de droga ideal para a promoção dos efeitos tipo-antidepressivo no teste do nado forçado, tal como relatado no presente trabalho. Os tratamentos com L-NAME foram inicialmente realizados de forma auxiliar para o caso de não obtermos a padronização com os experimentos comportamentais utilizando o 7-NI, mas foram obtidos resultados satisfatórios com o 7-NI o uso do L-NAME foi interrompido. Conforme discutido anteriormente, tanto os resultados obtidos com a administração intra CPFMV-PL de inibidores do NO quanto os dados agora discutidos com a administração sistêmica reforçam os dados da literatura sobre o sistema nitrérgico como alvo na busca de drogas com ação antidepressiva (revisado por Gregers Wegener, 2010; Dhir *et al.*, 2011). Integrando os resultados com administração sistêmica e intra CPFMV-PL dos inibidores da via do NO é viável propor que a inibição da formação de NO, no CPFMV-PL, durante a exposição ao estresse é um evento chave no mecanismo de ação dessas drogas na promoção de seus efeitos sobre a resposta comportamental.

Após a determinação das doses eficazes para os tratamentos sistêmicos foi então investigado o papel da via BDNF-TrkB e da mTOR, no CPFMV-PL, sobre os efeitos comportamentais do tratamento sistêmico com ketamina ou 7-NI. A injeção intra CPFMV-PL de K252a ou rapamicina, 5 minutos antes do tratamento sistêmico com ketamina ou 7-NI, não foi capaz de bloquear os efeitos comportamentais das drogas injetadas via i.p.

Recentemente, foi demonstrado que a administração i.p. de ketamina tem efeitos antidepressivos rápidos, em sessenta minutos, que são revertidos pela administração prévia (30 minutos antes da administração i.p.) de rapamicina (bloqueador da mTOR) no córtex pré-frontal medial ventral de ratos (Li *et al.*, 2010). Ainda segundo estes autores, os efeitos da ketamina no CPF de ratos são

relacionados a um aumento da síntese proteica e do número de botões sinápticos, sendo tais ações também bloqueadas pela rapamicina (Li *et al.*, 2010; Nanxin Li, 2011). Uma possível explicação para nossos resultados não corroborarem os de Li *et al.*, 2011, pode ser o uso do volume de injeção diferentes, pois em nosso estudo foi utilizado um volume de injeção bilateral de drogas (0,2uL/lado) suficiente para abranger o CPFMV-PL, enquanto no estudo anterior foram utilizados volumes suficientes para abranger todo o CPFM (1uL/lado). Considerando tal fato, é plausível supor que a inibição dos efeitos da ketamina sejam resultantes do bloqueio da mTOR em outras regiões do CPFM que não o PL. Entretanto, dados do nosso grupo de pesquisa mostraram que a administração prévia de rapamicina, no CPFMV-PL, na mesma dose e no mesmo tempo utilizado no presente trabalho foi capaz de bloquear o efeito tipo antidepressivo da administração sistêmica aguda (1h antes do TNF) de RG 108, um inibidor de metilação de DNA (Romano *et al.*, 2014), ou seja, a dose e o intervalo de administração aqui utilizados são de fato eficazes. Contudo, Autry *et al.*, 2011, mostrou que a administração sistêmica de rapamicina não foi capaz de impedir os efeitos de redução do tempo de imobilidade causados pela ketamina no teste do nado forçado (Autry *et al.*, 2011). Koike *et al.*, 2011, observou que a rapamicina foi capaz de bloquear apenas o efeito de longo prazo da ketamina no teste de suspensão pela cauda (Koike *et al.*, 2011b). Assim, de acordo com o que foi discutido até o momento, está esclarecido por diferentes procedimentos experimentais, que o efeito antidepressivo da ketamina tem uma relação com a via BDNF-TrkB-mTOR, mas ainda é necessário elucidar melhor os mecanismos e situações em que essa interação acontece. Portanto, nossos resultados ao não mostrarem o bloqueio do efeito tipo antidepressivo da ketamina, pela administração prévia rapamicina, sustentam a

necessidade de mais estudos para melhor compreender o papel da via BDNF-TrkB-mTOR nos efeitos da ketamina.

Em relação ao bloqueio prévio dos receptores Trk, já foi relatado que a administração intra-cerebroventricular de K252a, em camundongos, foi capaz de bloquear apenas os efeitos comportamentais de longo prazo da ketamina, administrada 24 horas antes do teste de hipofagia suprimida por novidade (HSN), mas não os efeitos de curto prazo quando a ketamina foi administrada 30 minutos antes do HSN (Koike *et al.*, 2013). Nossos resultados apresentados anteriormente, onde administração prévia de K252a não bloqueou os efeitos do LY 235959, no CPFMV-PL, vão nesse mesmo sentido, assim reforçando a hipótese proposta de que os efeitos rápidos do antagonismo NMDA podem ativar a mTOR por um mecanismo independente da participação de BDNF-TrkB. Então, como sugerido previamente, tal mecanismo seria decorrente da ativação dos receptores AMPA e das vias MEK/ERK e PI3K/AKT ativadas por este receptor, uma vez que estas são as mesmas ativadas pelo receptor TrkB e que agem sobre mTOR.

Quanto a ausência de bloqueio dos efeitos comportamentais do 7-NI pela administração prévia, intra CPFMV-PL, de K252a ou rapamicina, é possível considerar que as mesmas diferenças comentadas acima para a ketamina tenham interferido também nos experimentos com 7-NI. Como comentado anteriormente, já foi demonstrada uma interação entre as quantidades aumentadas de NO e a redução na liberação de BDNF no hipocampo, onde (1) o tratamento com 3-bromo-7-NI preveniu os efeitos comportamentais e redução da expressão de BDNF em animais cronicamente estressados (Yazir *et al.*, 2012) ou quando (2) a co-administração atorvastatina e 7-NI, azul de metileno ou ODQ, reduziu as quantidades de metabólitos do NO (nitrito e nitrato) e aumentou a expressão de BDNF de maneira correlacionada

a melhora da resposta comportamental em animais submetidos ao teste de suspensão pela cauda (Ludka *et al.*, 2013). Contudo, até o momento ainda não existem evidências de que o mecanismo de ação dos inibidores da nNOS dependeria das quantidades liberadas de BDNF ou das vias ativadas por essa neurotrofinas em regiões corticais. Como este é o primeiro estudo a avaliar o efeito do bloqueio dos receptores Trk ou da mTOR, no CPFMV-PL, sobre os efeitos comportamentais da injeção sistêmica de um inibidor preferencial da nNOS, não podemos excluir a possibilidade de que não observamos a interação entre os efeitos tipo antidepressivo do 7-NI com a via BDNF-TrkB-mTOR por não ocorrer tal interação no CPFMV-PL.

A interação do sistema nitrérgico pode ocorrer com outros sistemas de neurotransmissão, principalmente com o serotoninérgico, sendo essa interação importante para neurobiologia da depressão. O NO é capaz de interferir de forma negativa em diversos pontos do sistema serotoninérgico. Ele pode inativar uma enzima limitante para a síntese de serotonina, pode impedir a recaptação desse neurotransmissor e também inativá-lo (Guix *et al.*, 2005; Gregers Wegener, 2010; Dhir *et al.*, 2011). A administração do substrato para a formação de NO, a L-arginina, é capaz bloquear os efeitos do antidepressivo tricíclico imipramina, enquanto a administração de L-NAME pode potencializar os efeitos antidepressivo da fluoxetina, um inibidor seletivo da receptação de serotonina (revisado por Guix *et al.*, 2005; Wegener, 2010; Dhir *et al.*, 2011). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o efeito antidepressivo do NPA, em animais submetidos ao modelo do desempenho aprendido, é dependente da ativação dos receptores serotoninérgicos 5HT-1A no hipocampo (Hiroaki-Sato *et al.*, 2014). Desse modo, levando em conta que os resultados do presente projeto não indicam uma relação do efeito antidepressivo do NPA com a via BDNF-TrkB-mTOR, no CPFMV-PL, é possível sugerir que os

mecanismos dos efeitos comportamentais da inibição da nNOS na estrutura envolvam, por exemplo, interação com serotonina. Inclusive, o aumento da neurotransmissão serotoninérgica em regiões corticais é um evento importante para os efeitos de drogas antidepressivos. Através da técnica de microdiálise foi observado que antidepressivos como sertralina, fluvoxamina e paroxetina aumentam a concentração de serotonina extracelular no CPFM (Kitaichi *et al.*, 2010; Kaminska *et al.*, 2013).

Experimentos com análise da expressão de TrkB e mTOR

Nossos resultados comportamentais e farmacológicos não indicam a interação da inibição da nNOS com a via BDNF-Trk e mTOR, enquanto o antagonismo NMDA interagiu com a ativação da mTOR, no CPFMv-PL. Entretanto, mesmo com tais indícios, em nossa condição de análise comportamental de curto prazo, menos de 24 horas, não pode ser excluída a possibilidade de que a ketamina e o 7-NI poderiam alterar a expressão total ou a fosforilação dos receptores TrkB e da mTOR, pois no caso de antagonistas NMDA tais eventos já foram previamente demonstrados (Li *et al.*, 2010; Duman *et al.*, 2014; Lepack *et al.*, 2014).

Nossos experimentos demonstraram que a administração i.p. de ketamina ou 7-NI não foi capaz de aumentar a expressão do receptor TrkB (resíduo p706/707) e da proteína mTOR (resíduo ser2448) nas suas formas ativas (fosforiladas). Os animais receberam a injeção das drogas vinte e três horas após a exposição ao pré-teste do nado forçado e as amostras de CPFM foram coletadas com agulha de *punch* uma hora após o tratamento, ou seja, quando seriam submetidos ao teste.

Primeiramente, em relação aos resultados com a expressão/fosforilação do receptor TrkB, dados prévios da literatura mostram que a fosforilação do receptor TrkB

estava aumentada no hipocampo de camundongos, trinta minutos após a administração sistêmica de ketamina ou MK-801 (Autry *et al.*, 2011). Nesse mesmo estudo foi observado que animais haploinsuficientes para o BDNF ou knockout para o receptor TrkB não respondiam ao tratamento com ketamina ou MK-801 quando expostos ao TNF (Autry *et al.*, 2011). Corroborando tais achados, o efeito comportamental da ketamina foi abolido quando o BDNF extracelular foi neutralizado pela administração de um anticorpo anti-BDNF no CPFM (Lepack *et al.*, 2014). Já em relação ao inibidor da nNOS, 7-NI, como discutido anteriormente, existem evidências da interação entre as quantidades aumentadas de NO e a redução na liberação de BDNF no hipocampo tanto quanto os efeitos do 3-bromo-7-NI em aumentar expressão de BDNF em animais cronicamente estressados (Yazir *et al.*, 2012) ou submetidos ao teste de suspensão pela cauda (Ludka *et al.*, 2013) nessa mesma região. Lembrando que o presente trabalho é o primeiro a investigar diretamente o efeito de um inibidor da nNOS sobre a expressão e fosforilação de TrkB no CPFM.

Quanto aos resultados com a expressão/fosforilação da mTOR, já foi demonstrado que a ketamina é capaz de aumentar a expressão de mTOR fosforilada, no resíduo ser2448, no CPF de animais não estressados, sendo as amostras também coletadas uma hora após o tratamento (Li *et al.*, 2010). Esses resultados foram corroborados por estudos posteriores, tanto em amostras do córtex pré-frontal quanto do hipocampo (Yang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014). Em cultura de neurônios do hipocampo também foi visto que a ketamina é capaz de aumentar a fosforilação da mTOR tanto quanto em outras proteínas da cascata da mTOR (Park *et al.*, 2014). Porém, em um estudo que avaliou o efeito da ketamina sobre expressão de mTOR no hipocampo, 30 minutos ou 24h após o tratamento com ketamina, não foram observadas alterações em relação aos controles (Autry *et al.*, 2011).

Sumarizando a literatura discutida nos últimos dois parágrafos é possível observar que nossos resultados não estão de acordo com o que foi visto na maioria dos trabalhos. As condições de dose e tempo de coleta após a administração das drogas utilizados no presente trabalho são similares ao que é descrito pela literatura, porém nossas amostras são CPFMv, enquanto os demais trabalhos fazem análise com amostras do CPF inteiro. Tal diferença pode ter sido determinante, uma vez que nossas amostras são menores, compreendendo principalmente as regiões cingulada, pré-límbica, intra-límbica e dorso peduncular pertencente ao CPFMv, enquanto ao se coletar amostras do CPF estão sendo incluídas todas as regiões desta estrutura. Dessa forma, mais estudos são necessários para elucidar em quais regiões do CPF ocorrem aumentos da expressão/fosforilação de TrkB e mTOR que podem ser determinantes para os efeitos da ketamina ou 7-NI.

Outras considerações ainda podem ser feitas em relação a esses resultados. Em nossos experimentos com estresse os nossos animais foram expostos ao pré-teste do nado forçado, enquanto os animais utilizados no trabalho de *Li et al, 2010* não foram submetidos a nenhum estressor. Recentemente foi demonstrado que o estresse pode induzir a expressão da proteína REDD1, a qual seria capaz de impedir a ativação da mTOR no CPFM (Ota *et al.*, 2014), sendo que esse pode ser um fator de interferência que nos impediu de corroborar os dados encontrados na literatura quanto aos efeitos moleculares da ketamina. Da mesma forma, com os dois inibidores da NOS é possível considerar que as mesmas diferenças comentadas acima para a ketamina também tenham interferido para a ausência de efeitos moleculares. Esse é o primeiro estudo a avaliar o efeito molecular sobre a via BDNF-TrkB e da mTOR, no CPFMv, da injeção sistêmica de 7-NI. Desse modo, não podemos excluir a possibilidade de que não observamos o aumento da fosforilação de TrkB e mTOR

com o tratamento com 7-NI por essa droga não promover a ativação desses alvos para a produção de seus efeitos comportamentais. Assim, mais estudos envolvendo (1) as regiões do CPF, (2) o tempo de coleta de amostra após a administração das drogas e (3) a intensidade e duração modelos de estresse utilizados, são necessários para investigar os efeitos da ketamina ou 7-NI sobre a via BDNF-TrkB e mTOR.

Vale ressaltar que para ambas as proteínas, TrkB e mTOR, foram avaliadas a fosforilação nos sítios conhecidos por serem os principais alvos de drogas com ação antidepressiva (Saarelainen *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2010). Entretanto, foi demonstrado recentemente que o receptor TrkB pode ser ativado através de outros sítios de fosforilação, resíduos Y515 e Y816, que podem ser alvo de diferentes tratamentos com efeito tipo-antidepressivo, tal como a estimulação do nervo vago (Carreno *et al.*, 2014). Dessa forma, considerando que não obtivemos resultados sobre a fosforilação de TrkB condizentes com a literatura, é possível que as drogas aqui investigadas possam agir através de outros sítios de fosforilação do receptor TrkB. Portanto, é de interesse para futuros estudos investigar se os efeitos tipo-antidepressivo da ketamina ou 7-NI envolvem outros sítios de fosforilação do receptor TrkB.

Finalmente, levando em conta todo o corpo de resultados do presente trabalho, fica claro que os sistemas glutamatérgico, nitrérgico e de neurofinas (via BDNF) desempenham papéis fundamentais na neurobiologia da depressão. A continuidade de estudos comportamentais envolvendo esses sistemas é de grande interesse para o desenvolvimento de melhores drogas antidepressivas.

6. Conclusões

Os resultados do presente trabalho permitem concluir:

- A inibição da via do óxido nítrico, bem como o bloqueio de receptores NMDA no CPFMV-PL, promove um efeito do tipo antidepressivo no nado forçado, dependendo do momento de administração da droga;
- A atividade dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA do CPFMV-PL é necessária para o desenvolvimento do efeito tipo-antidepressivo do antagonismo dos receptores NMDA na mesma região;
- Os efeitos comportamentais da inibição da nNOS no CPFMV-PL parecem ser independentes da ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA;
- A administração de BDNF no CPFMV-PL promove efeito tipo-antidepressivo mediante a ativação de receptores Trk e da mTOR;
- O efeito tipo antidepressivo do antagonismo dos receptores NMDA no CPFMV-PL depende de receptores AMPA e da ativação de mTOR, mas não depende da ativação de Trk.
- O efeito tipo antidepressivo da inibição da nNOS no CPFMV-PL independe da ativação de AMPA, Trk e mTOR, indicando que as vias NMDA e NO estão dissociadas no CPFMV durante a modulação das respostas comportamentais ao nado forçado;
- Os efeitos antidepressivos promovidos pela administração sistêmica de ketamina ou 7-NI não dependem da ativação de receptores Trk ou da mTOR no CPFMV-PL, uma vez que esses efeitos não foram bloqueados pela administração local de k252a e rapamicina, bem como não foram observadas alterações na expressão de BDNF, TrkB e mTOR nessa estrutura.;

- Em conjunto, os resultados corroboram o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica mediada por NMDA e da síntese de NO no CPFMV na modulação de alterações comportamentais induzidas pelo estresse. No entanto, esses efeitos parecem estar dissociados e parcialmente relacionados a modulação da via e BDNF-TrKB-mTOR do CPFMV-PL.

Referências Bibliográficas

- ABDALLAH CG, SANACORA G, DUMAN RS, KRYSTAL JH. Ketamine and rapid-acting antidepressants: a window into a new neurobiology for mood disorder therapeutics. Annual review of medicine 66: p. 509-523, 2015.
- AGUIAR DC, MOREIRA FA, GUIMARAES FS. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-d-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. Pharmacol Biochem Behav 83(2): 296-301, 2006.
- AKAIKE A, KATSUKI H, KUME T, MAEDA T. Reactive oxygen species in NMDA receptor-mediated glutamate neurotoxicity. Parkinsonism Relat Disord 5(4): 203-207, 1999.
- ALT A, NISENBAUM ES, BLEAKMAN D, WITKIN JM. A role for AMPA receptors in mood disorders. Biochem Pharmacol 71(9): 1273-1288, 2006.
- ALTAR CA, BOYLAN CB, FRITSCHKE M, JACKSON C, HYMAN C, LINDSAY RM. The neurotrophins NT-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviorally effective infusions to the substantia nigra. Exp Neurol 130(1): 31-40, 1994.
- AMAT J, BARATTA MV, PAUL E, BLAND ST, WATKINS LR, MAIER SF. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. Nat Neurosci 8(3): 365-371, 2005.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013.
- ANGST J, GAMMA A. Diagnosis and course of affective psychoses: was Kraepelin right? Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 258 Suppl 2: 107-110, 2008.
- AUTRY AE, ADACHI M, NOSYREVA E, NA ES, LOS MF, CHENG PF, *ET AL*. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. Nature 475(7354): 91-5, 2011.
- AZBILL RD, MU X, SPRINGER JE. Riluzole increases high-affinity glutamate uptake in rat spinal cord synaptosomes. Brain Res 871(2): 175-180, 2000.
- BALE TL. Stress sensitivity and the development of affective disorders. Horm Behav 50(4): 529-533, 2006
- BARBON A, CARACCIOLO L, ORLANDI C, MUSAZZI L, MALLEI A, LA VIA L, *et al*. Chronic antidepressant treatments induce a time-dependent up-regulation of AMPA receptor subunit protein levels. Neurochem Int 59(6): 896-905, 2011.
- BERMAN RM, CAPPIELLO A, ANAND A, OREN DA, HENINGER GR, CHARNEY DS, *et al*. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. Biol Psychiatry 47(4): 351-354, 2000.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254, 1976.

BRINKS V, VAN DER MARK MH, DE KLOET ER, OITZL MS. Differential MR/GR activation in mice results in emotional states beneficial or impairing for cognition. Neural Plast 2007: 90163, 2007.

BROWN SM, HENNING S, WELLMAN CL. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. Cereb Cortex 15(11): 1714-1722, 2005.

BROWNE CA, LUCKI I. Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants. Frontiers in pharmacology 4: 161, 2013.

BURGDORF J, ZHANG XL, NICHOLSON KL, BALSTER RL, LEANDER JD, STANTON PK, *et al.* GLYX-13, a NMDA receptor glycine-site functional partial agonist, induces antidepressant-like effects without ketamine-like side effects. Neuropsychopharmacology 38(5): 729-742, 2013.

CALABRESE F, MOLTENI R, RACAGNI G, RIVA MA. Neuronal plasticity: A link between stress and mood disorders. Psychoneuroendocrinology 34 Suppl 1:S208-16, 2009.

CALABRESE V, MANCUSO C, CALVANI M, RIZZARELLI E, BUTTERFIELD DA, STELLA AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. Nat Rev Neurosci 8(10): 766-775, 2007.

CAMPBELL S, MACQUEEN G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. J Psychiatry Neurosci 29(6): 417-426, 2004.

CARRENO FR, FRAZER A. Activation of signaling pathways downstream of the brain-derived neurotrophic factor receptor, TrkB, in the rat brain by vagal nerve stimulation and antidepressant drugs. Int J Neuropsychopharmacol 17(2): 247-258, 2014.

CASTREN E. Is mood chemistry? Nat Rev Neurosci 6(3): 241-246, 2005.

CASTREN E, RANTAMAKI T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. Dev Neurobiol 70(5): 289-297, 2010.

CHRISTOPHERSON KS, HILLIER BJ, LIM WA, BREDT DS. PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. J Biol Chem 274(39): 27467-27473, 1999.

CONTRACTOR A, HEINEMANN SF. Glutamate receptor trafficking in synaptic plasticity. Sci STKE (156): re14, 2002.

COPPEN A. The biochemistry of affective disorders. Br J Psychiatry 113(504): 1237-1264, 1967.

COSTA-MATTIOLI M, MONTEGGIA LM. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. Nat Neurosci 16(11): 1537-1543, 2013.

COUTINHO V, KNOPFEL T. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. Neuroscientist 8(6): 551-561, 2002.

CRYAN JF, PAGE ME, LUCKI I. Differential behavioral effects of the antidepressant Reboxetine, Fluoxetine and Moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. Psychopharmacology 182(3): 335-44, 2005.

CZECH B, MULLER-KEUKER JI, RYGULA R, ABUMARIA N, HIEMKE C, DOMENICI E, *et al.* Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. Neuropsychopharmacology 32(7): 1490-1503, 2007.

CZECH B, PEREZ-CRUZ C, FUCHS E, FLUGGE G. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? Behav Brain Res 190(1): 1-13, 2008.

DAWSON VL, DAWSON TM, LONDON ED, BREDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci USA 88(14):6368-71, 1991.

DE KLOET ER, JOELS M, HOLSBOER F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci 6(6): 463-475, 2005.

DETKE MJ, RICKELS M, LUCKI I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. Psychopharmacology (Berl) 121(1): 66-72, 1995.

DEVECI A, AYDEMIR O, TASKIN O, TANELI F, ESEN-DANACI A. Serum BDNF levels in suicide attempters related to psychosocial stressors: a comparative study with depression. Neuropsychobiology 56(2-3): 93-97, 2007.

DHIR A, KULKARNI SK. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 31(4): 921-925, 2007.

DHIR A, KULKARNI SK. Nitric oxide and major depression. Nitric Oxide 24(3): 125-131, 2011.

DOUCET MV, HARKIN A, DEV KK. The PSD-95/nNOS complex: new drugs for depression? Pharmacol Ther 133(2): 218-229, 2012.

DOUCET MV, LEVINE H, DEV KK, HARKIN A. Small-molecule inhibitors at the PSD-95/nNOS interface have antidepressant-like properties in mice. Neuropsychopharmacology 38(8): 1575-1584, 2013.

DREVETS WC. Neuroimaging studies of mood disorders. Biol Psychiatry 48(8): 813-829, 2000.

DUMAN RS, AGHAJANIAN GK. Neurobiology of rapid acting antidepressants: role of BDNF and GSK-3 β . Neuropsychopharmacology 39(1): 233, 2014.

DUMAN RS, LI N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 367(1601): 2475-2484, 2012.

FASSINI A, SCOPINHO AA, RESSTEL LB, CORREA FM. Opioid receptors in the prelimbic cortex modulate restraint stress-induced cardiovascular responses in the rat. Neuropharmacology 85: 367-374, 2014.

FIGUROV A, POZZO-MILLER LD, OLAFSSON P, WANG T, LU B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. Nature 381(6584): 706-709, 1996.

FINKEL MS, LAGHRISSI-THODE F, POLLOCK BG, RONG J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. Psychopharmacol Bull 32(4): 653-658, 1996.

FLORENZANO F, VISCOMI MT, AMADIO S, D'AMBROSI N, VOLONTE C, MOLINARI M. Do ATP and NO interact in the CNS? Prog Neurobiol 84(1): 40-56, 2008.

FRIZZO ME, DALL'ONDER LP, DALCIN KB, SOUZA DO. Riluzole enhances glutamate uptake in rat astrocyte cultures. Cell Mol Neurobiol 24(1): 123-128, 2004.

GALECKI P, MAES M, FLORKOWSKI A, LEWINSKI A, GALECKA E, BIENKIEWICZ M, *et al.* An inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with the risk of recurrent depressive disorder. Neurosci Lett 486(3): 184-187, 2010.

GALVAN A, KUWAJIMA M, SMITH Y. Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? Neuroscience 143(2): 351-375, 2006.

GARTHWAITE J, GARTHWAITE G, PALMER RM, MONCADA S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. Eur J Pharmacol 172(4-5): 413-416, 1989.

GHAFOURIFAR P, CADENAS E. Mitochondrial nitric oxide synthase. Trends Pharmacol Sci 26(4): 190-195, 2005.

GIGLIUCCI V, BUCKLEY KN, NUNAN J, O'SHEA K, HARKIN A. A role for serotonin in the antidepressant activity of NG-Nitro-L-arginine, in the rat forced swimming test. Pharmacol Biochem Behav 94(4): 524-533, 2010.

GIGLIUCCI V, GORMLEY S, GIBNEY S, ROUINE J, KERSKENS C, CONNOR TJ, *et al.* Characterisation of the antidepressant properties of nitric oxide synthase inhibitors in the olfactory bulbectomised rat model of depression. Eur Neuropsychopharmacol 24(8): 1349-1361, 2014.

GLADDING CM, RAYMOND LA. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. Mol Cell Neurosci 48(4):308-20, 2011.

GOGGI J, PULLAR IA, CARNEY SL, BRADFORD HF. Modulation of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in rat brain striatal slices in vitro. Brain Res 941(1-2): 34-42, 2002.

WEGENER G, VOLKE V. Nitric oxide synthase inhibitors as antidepressants Pharmaceuticals 3: 26, 2010.

GUIX FX, URIBESALGO I, COMA M, MUNOZ FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. Prog Neurobiol 76(2): 126-152, 2005.

GUERINI A, JOCA SRL. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effects of cannabidiol administered into the ventral medial prefrontal cortex of male wistar rats. *Submetido para publicação*, 2014.

GURURAJAN A, VAN DEN BUUSE M. Is the mTOR-signalling cascade disrupted in Schizophrenia? J Neurochem 129(3): 377-387, 2014.

HAMANI C, DIWAN M, MACEDO CE, BRANDAO ML, SHUMAKE J, GONZALEZ-LIMA F, *et al.* Antidepressant-Like Effects of Medial Prefrontal Cortex Deep Brain Stimulation in Rats. Biol Psychiatry 67(2):117-24, 2010.

HARA MR, SNYDER SH. Cell signaling and neuronal death. Annu Rev Pharmacol Toxicol 47: 117-141, 2007.

HARDINGHAM GE, BADING H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. Nat Rev Neurosci 11(10): 682-696, 2010.

HARDINGHAM GE, FUKUNAGA Y, BADING H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. Nat Neurosci 5(5): 405-414, 2002.

HARKIN A, CONNOR TJ, BURNS MP, KELLY JP. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. Eur Neuropsychopharmacol 14(4): 274-281, 2004.

HARKIN A, CONNOR TJ, WALSH M, ST JOHN N, KELLY JP. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. Neuropharmacology 44(5): 616-623, 2003.

HARKIN AJ, BRUCE KH, CRAFT B, PAUL IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. Eur J Pharmacol 372(3): 207-213, 1999.

HARVEY BH, OOSTHUIZEN F, BRAND L, WEGENER G, STEIN DJ. Stress-restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. Psychopharmacology (Berl) 175(4): 494-502, 2004.

HEIDBREder CA, GROENEWEGEN HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev 27(6): 555-579, 2003.

HINDMARCH I. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. Eur Psychiatry 17 Suppl 3: 294-299, 2002.

HIROAKI-SATO VA, SALES AJ, BIOJONE C, JOCA SR. Hippocampal nNOS inhibition induces an antidepressant-like effect: involvement of 5HT1A receptors. Behav Pharmacol 25(3): 187-196, 2014.

HOEFFER CA, KLANN E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. Trends Neurosci 33(2): 67-75, 2010.

IZQUIERDO A, WELLMAN CL, HOLMES A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. J Neurosci 26(21): 5733-5738, 2006.

JEFFERYS D, FUNDER J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. Eur J Pharmacol 295(2-3): 131-135, 1996.

JIMENEZ-SANCHEZ L, CAMPA L, AUBERSON YP, ADELL A. The role of GluN2A and GluN2B subunits on the effects of NMDA receptor antagonists in modeling schizophrenia and treating refractory depression. Neuropsychopharmacology 39(11): 2673-2680, 2014.

JOCA SR, FERREIRA FR, GUIMARAES FS. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrergic neurotransmitter systems. Stress 10(3): 227-249, 2007.

JOCA SR, GUIMARAES FS. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. Psychopharmacology (Berl) 185(3): 298-305, 2006.

KAFITZ KW, ROSE CR, KONNERTH A. Neurotrophin-evoked rapid excitation of central neurons. Prog Brain Res 128: 243-249, 2000.

KAFITZ KW, ROSE CR, THOENEN H, KONNERTH A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. Nature 401(6756): 918-921, 1999.

KAMINSKA K, GOLEMBIOWSKA K, ROGOZ Z. Effect of risperidone on the fluoxetine-induced changes in extracellular dopamine, serotonin and noradrenaline in the rat frontal cortex. Pharmacol Rep 65(5): 1144-1151, 2013.

KANEKO M, SAITO Y, SAITO H, MATSUMOTO T, MATSUDA Y, VAUGHT JL, *et al.* Neurotrophic 3,9-bis[(alkylthio)methyl]-and-bis(alkoxymethyl)-K-252a derivatives. J Med Chem 40(12): 1863-1869, 1997.

KAPLAN A. The conduct of inquiry. Methodology for behavioural science. International Textbook Company, Ltd., Aylesbury, Buck. 1973.

KAROLEWICZ B, PAUL IA, ANTKIEWICZ-MICHALUK L. Effect of NOS inhibitor on forced swim test and neurotransmitters turnover in the mouse brain. Pol J Pharmacol 53(6): 587-596, 2001.

MATTHEWS K, CHRISTMAS D, JOHN SWAN, ELEANOR SORRELL. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 29(4-5): 503-13, 2005.

KITAICHI Y, INOUE T, NAKAGAWA S, BOKU S, KAKUTA A, IZUMI T, *et al.* Sertraline increases extracellular levels not only of serotonin, but also of dopamine in the nucleus accumbens and striatum of rats. Eur J Pharmacol 647(1-3): 90-96, 2010.

KNUSEL B, HEFTI F. K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. J Neurochem 59(6): 1987-1996, 1992.

KOENIGS M, GRAFMAN J. The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. Behav Brain Res 201(2): 239-243, 2009.

KOIKE H, FUKUMOTO K, IJIMA M, CHAKI S. Role of BDNF/TrkB signaling in antidepressant-like effects of a group II metabotropic glutamate receptor antagonist in animal models of depression. Behav Brain Res 238: 48-52, 2013.

KOIKE H, IJIMA M, CHAKI S. Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. Behav Brain Res 224(1): 107-111, 2011a.

KOIKE H, IJIMA M, CHAKI S. Involvement of the mammalian target of rapamycin signaling in the antidepressant-like effect of group II metabotropic glutamate receptor antagonists. Neuropharmacology 61(8): 1419-1423, 2011b.

KUGAYA A, SANACORA G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. CNS Spectr 10(10): 808-819, 2005.

KUNZ J, HALL MN. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. Trends in biochemical sciences 18(9): 334-338, 1993.

LEE AL, OGLE WO, SAPOLSKY RM. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. Bipolar Disord 4(2): 117-128, 2002.

LEE BH, KIM YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. Psychiatry investigation 7(4): 231-235, 2010.

LEPACK AE, FUCHIKAMI M, DWYER JM, BANASR M, DUMAN RS. BDNF release is required for the behavioral actions of ketamine. Int J Neuropsychopharmacol 18(1), 2014.

LEVEILLE F, EL GAAMOUCHE F, GOUIX E, LECOCQ M, LOBNER D, NICOLE O, *et al.* Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. FASEB J 22(12): 4258-4271, 2008.

LEVINE J, PANCHALINGAM K, RAPOPORT A, GERSHON S, MCCLURE RJ, PETTEGREW JW. Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. Biol Psychiatry 47(7): 586-593, 2000.

LI N, LEE B, LIU RJ, BANASR M, DWYER JM, IWATA M, *et al.* mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. Science 329(5994): 959-964, 2010.

LI N, LIU RJ, DWYER JM, BANASR M, LEE B, SON H, *et al.* Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. Biol Psychiatry 69(8): 754-761, 2011.

LI X, TIZZANO JP, GRIFFEY K, CLAY M, LINDSTROM T, SKOLNICK P. Antidepressant-like actions of an AMPA receptor potentiator (LY392098). Neuropharmacology 40(8): 1028-1033, 2001.

LINDHOLM JS, AUTIO H, VESA L, ANTILA H, LINDEMANN L, HOENER MC, *et al.* The antidepressant-like effects of glutamatergic drugs ketamine and AMPA receptor potentiator LY 451646 are preserved in bdnf(+)/(-) heterozygous null mice. Neuropharmacology 62(1): 391-397, 2012.

LIU RJ, FUCHIKAMI M, DWYER JM, LEPACK AE, DUMAN RS, AGHAJANIAN GK. GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine. Neuropsychopharmacology 38(11): 2268-2277, 2013.

LIU RJ, LEE FS, LI XY, BAMBICO F, DUMAN RS, AGHAJANIAN GK. Brain-derived neurotrophic factor Val66Met allele impairs basal and ketamine-stimulated synaptogenesis in prefrontal cortex. Biol Psychiatry 71(11): 996-1005, 2012.

LONGO FM, MASSA SM. Small-molecule modulation of neurotrophin receptors: a strategy for the treatment of neurological disease. Nat Rev Drug Discov 12(7): 507-525, 2013.

LOPEZ JF, CHALMERS DT, LITTLE KY, WATSON SJ. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. Biol Psychiatry 43(8): 547-573, 1998.

LUDKA FK, ZOMKOWSKI AD, CUNHA MP, DAL-CIM T, ZENI AL, RODRIGUES AL, *et al.* Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. Eur Neuropsychopharmacol 23(5): 400-412, 2013.

MACHADO-VIEIRA R, IBRAHIM L, HENTER ID, ZARATE CA, JR. Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. Pharmacol Biochem Behav 100(4): 678-687, 2012.

MAENG S, ZARATE CA, JR., DU J, SCHLOESSER RJ, MCCAMMON J, CHEN G, *et al.* Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. Biol Psychiatry 63(4): 349-352, 2008.

MALBERG JE, BLENDY JA. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. Trends Pharmacol Sci 26(12): 631-638, 2005.

MANJI HK, DREVETS WC, CHARNEY DS. The cellular neurobiology of depression. Nat Med 7(5): 541-547, 2001.

MAO L, TANG Q, SAMDANI S, LIU Z, WANG JQ. Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons. Eur J Neurosci 19(5): 1207-1216, 2004.

MARTIN JL, FINSTERWALD C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. Commun Integr Biol 4(1): 14-16, 2011.

MARTINOWICH K, MANJI H, LU B (). New insights into BDNF function in depression and anxiety. Nat Neurosci 10(9): 1089-1093, 2007.

MASSA SM, YANG T, XIE Y, SHI J, BILGEN M, JOYCE JN, *et al.* Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. J Clin Invest 120(5): 1774-1785, 2010.

MATHEWS DC, HENTER ID, ZARATE CA. Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. Drugs 72(10): 1313-1333, 2012.

MCARTHUR R, BORSINI F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. Pharmacol Biochem Behav 84(3): 436-452, 2006.

MCEWEN BS. Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. Ann N Y Acad Sci 1032: 1-7, 2004.

MCEWEN BS, MAGARINOS AM. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. Ann N Y Acad Sci 821: 271-284, 1997.

MILLAN MJ. Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. Pharmacol Ther 110(2): 135-370, 2006.

MIZOGUCHI Y, MONJI A, KATO TA, HORIKAWA H, SEKI Y, KASAI M, *et al.* Possible role of BDNF-induced microglial intracellular Ca(2+) elevation in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Mini reviews in medicinal chemistry 11(7): 575-581, 2011.

MOGHADDAM B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. J Neurochem 60(5): 1650-1657, 1993.

MOGHADDAM B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. Biol Psychiatry 51(10): 775-787, 2002.

MONCADA S, HIGGS A, FURCHGOTT R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. Pharmacol Rev 49(2): 137-142, 1997

MORILAK DA, FRAZER A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. Int J Neuropsychopharmacol 7(2): 193-218, 2004.

MULINARI S. Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research. Journal of the history of the neurosciences 21(4): 366-392, 2012.

MURAKAMI T, YAMANE H, TOMONAGA S, FURUSE M. Forced swimming and imipramine modify plasma and brain amino acid concentrations in mice. Eur J Pharmacol 602(1): 73-77, 2009.

MUSAZZI L, MILANESE M, FARISELLO P, ZAPPETTINI S, TARDITO D, BARBIERO VS, *et al.* Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. PLoS One 5(1): e8566, 2010.

MUSAZZI L, TRECCANI G, POPOLI M. Glutamate hypothesis of depression and its consequences for antidepressant treatments. Expert review of neurotherapeutics 12(10): 1169-1172, 2012.

MUTLU O, ULAK G, LAUGERAY A, BELZUNG C. Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice. Pharmacol Biochem Behav 92(1): 82-87, 2009.

NAGAHARA AH, TUSZYNSKI MH (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. Nat Rev Drug Discov 10(3): 209-219.

NANXIN LI R-JL, JASON M. DWYER, MOUNIRA BANASR, BOYOUNG LEE, HYEON SON, XIAO-YUAN LI, GEORGE AGHAJANIAN, AND RONALD S. DUMAN. Glutamate N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists Rapidly Reverse Behavioral and Synaptic Deficits Caused by Chronic Stress Exposure. Biol Psychiatry 69(8):754-61, 2011.

NATIONS KR, DOGTEROM P, BURSI R, SCHIPPER J, GREENWALD S, ZRAKET D, *et al.* (). Examination of Org 26576, an AMPA receptor positive allosteric modulator, in patients diagnosed with major depressive disorder: an exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Psychopharmacol 26(12):1525-39, 2012.

NAVA N, TRECCANI G, LIEBENBERG N, CHEN F, POPOLI M, WEGENER G, *et al.* Chronic desipramine prevents acute stress-induced reorganization of medial prefrontal cortex architecture by blocking glutamate vesicle accumulation and excitatory synapse increase. Int J Neuropsychopharmacol 18(3), 2014.

NAYLOR GJ, SMITH AH, CONNELLY P. A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. Biol Psychiatry 22(5): 657-659, 1987.

NESTLER EJ, BARROT M, DILEONE RJ, EISCH AJ, GOLD SJ, MONTEGGIA LM. Neurobiology of depression. Neuron 34(1): 13-25, 2002b.

NOWAK G, TRULLAS R, LAYER RT, SKOLNICK P, PAUL IA. Adaptive changes in the N-methyl-D-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine

and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. J Pharmacol Exp Ther 265(3): 1380-1386, 1993.

O'NEIL MF, MOORE NA. Animal models of depression: are there any? Hum Psychopharmacol 18(4): 239-254, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *The global burden of disease: 2004 update*. edn. World Health Organization: Geneva. 2008.

OTA KT, LIU RJ, VOLETI B, MALDONADO-AVILES JG, DURIC V, IWATA M, *et al*. REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior. Nat Med 20(5): 531-535, 2014.

PAOLETTI P, BELLONE C, ZHOU Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat Rev Neurosci 14(6): 383-400, 2013.

PARK SW, LEE JG, SEO MK, LEE CH, CHO HY, LEE BJ, *et al*. Differential effects of antidepressant drugs on mTOR signalling in rat hippocampal neurons. Int J Neuropsychopharmacol 17(11): 1831-1846, 2014.

PEREIRA VS, CASAROTTO PC, HIROAKI-SATO VA, SARTIM AG, GUIMARAES FS, JOCA SR. Antidepressant- and anticomulsive-like effects of purinergic receptor blockade: Involvement of nitric oxide. Eur Neuropsychopharmacol 23(12):1769-78, 2013.

PEREIRA VS, ROMANO A, WEGENER G, JOCA SR. Antidepressant-like effects induced by NMDA receptor blockade and NO synthesis inhibition in the ventral medial prefrontal cortex of rats exposed to the forced swim test. Psychopharmacology (Berl), 2015.

PITTALUGA A, RAITERI L, LONGORDO F, LUCCINI E, BARBIERO VS, RACAGNI G, *et al*. Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus. Neuropharmacology 53(1): 27-36, 2007.

PORSOLT RD, BROSSARD G, HAUTOBOIS C, ROUX S. Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. Curr Protoc Neurosci Chapter 8: Unit 8 10A, 2001.

PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature 266(5604): 730-732, 1977.

PORTELLA MJ, DE DIEGO-ADELINO J, GOMEZ-ANSON B, MORGAN-FERRANDO R, VIVES Y, PUIGDEMONT D, *et al*. Ventromedial prefrontal spectroscopic abnormalities over the course of depression: A comparison among first episode, remitted recurrent and chronic patients. J Psychiatr Res 45(4):427-34, 2010.

POST RM. Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. J Psychiatr Res 41(12): 979-990, 2007.

PRESKORN SH, BAKER B, KOLLURI S, MENNITI FS, KRAMS M, LANDEN JW. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the

NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. J Clin Psychopharmacol 28(6): 631-637, 2008.

PRICE JL, DREVETS WC. Neurocircuitry of Mood Disorders. Neuropsychopharmacology 49(4):2966-76, 2009.

PRYOR WA, HOUK KN, FOOTE CS, FUKUTO JM, IGNARRO LJ, SQUADRITO GL, *et al.* Free radical biology and medicine: it's a gas, man! Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 291(3): R491-511, 2006.

RESSTEL LB, CORREA FM. Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. Neuropharmacology 51(1): 160-167, 2006.

RESSTEL LB, CORREA FM, GUIMARAES FS. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. Cereb Cortex 18(9): 2027-2035, 2008.

RICCI V, MARTINOTTI G, GELFO F, TONIONI F, CALTAGIRONE C, BRIA P, *et al.* Chronic ketamine use increases serum levels of brain-derived neurotrophic factor. Psychopharmacology (Berl) 215(1): 143-148, 2011.

RISTERUCCI C, COCCURELLO R, BANASR M, STUTZMANN JM, AMALRIC M, NIEOULLON A. The metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonist MPEP and the Na⁺ channel blocker riluzole show different neuroprotective profiles in reversing behavioral deficits induced by excitotoxic prefrontal cortex lesions. Neuroscience 137(1): 211-220, 2006.

ROCHER C, SPEDDING M, MUNOZ C, JAY TM. Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. Cereb Cortex 14(2): 224-229, 2004.

ROENKER NL, GUDELSKY GA, AHLBRAND R, HORN PS, RICHTAND NM. Evidence for involvement of nitric oxide and GABA(B) receptors in MK-801- stimulated release of glutamate in rat prefrontal cortex. Neuropharmacology 63(4): 575-581, 2012.

ROMANO ACDS, JOCA SRL. Participação da via BDNF-TrkB-mTOR do córtex pré-frontal medial ventral no efeito tipo antidepressivo induzido por inibidores da metilação do DNA. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2014.

ROSE CR, BLUM R, KAFITZ KW, KOVALCHUK Y, KONNERTH A. From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. Bioessays 26(11): 1185-1194, 2004

RYGULA R, ABUMARIA N, DOMENICI E, HIEMKE C, FUCHS E. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. Behav Brain Res 174(1): 188-192, 2006.

SAARELAINEN T, HENDOLIN P, LUCAS G, KOPONEN E, SAIRANEN M, MACDONALD E, *et al.* Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. J Neurosci 23(1): 349-357, 2003.

SALVADORI M. Antineoplastic effects of mammalian target of rapamycin inhibitors. World journal of transplantation 2(5): 74-83, 2012.

SANACORA G, GUEORGUIEVA R, EPPERSON CN, WU YT, APPEL M, ROTHMAN DL, *et al.* Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. Arch Gen Psychiatry 61(7): 705-713, 2004.

SANACORA G, KENDELL SF, LEVIN Y, SIMEN AA, FENTON LR, CORIC V, *et al.* Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms. Biol Psychiatry 61(6): 822-825, 2007.

SANACORA G, TRECCANI G, POPOLI M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. Neuropharmacology 62(1): 63-77, 2012.

SAPOLSKY RM. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? Biol Psychiatry 56(3): 137-139, 2004.

SARTORIUS A, MAHLSTEDT MM, VOLLMAYR B, HENN FA, ENDE G. Elevated spectroscopic glutamate/gamma-amino butyric acid in rats bred for learned helplessness. Neuroreport 18(14): 1469-1473, 2007.

SARTORIUS N. Concepts of depression: sporadic revolutions of continuous evolution. Hum Psychopharmacol 16(S1): S3-S6, 2001.

SCHILDKRAUT JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. Am J Psychiatry 122(5): 509-522, 1965.

SCHUMACHER J, JAMRA RA, BECKER T, OHLRAUN S, KLOPP N, BINDER EB, *et al.* Evidence for a relationship between genetic variants at the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) locus and major depression. Biol Psychiatry 58(4): 307-314, 2005.

SCOPINHO AA, SCOPINHO M, LISBOA SF, CORREA FM, GUIMARAES FS, JOCA SR. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. Behav Brain Res 214(2): 437-442, 2010.

SEGOVIA G, PORRAS A, MORA F. Effects of a nitric oxide donor on glutamate and GABA release in striatum and hippocampus of the conscious rat. Neuroreport 5(15): 1937-1940, 1994.

SEN S, DUMAN R, SANACORA G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. Biol Psychiatry 64(6): 527-532, 2008.

SHORS TJ, SEIB TB, LEVINE S, THOMPSON RF. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. Science 244(4901): 224-226, 1989.

SILVA M, AGUIAR DC, DINIZ CR, GUIMARAES FS, JOCA SR. Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. Cell Mol Neurobiol 32(3): 443-453, 2012.

SKOLNICK P. Modulation of glutamate receptors: strategies for the development of novel antidepressants. Amino Acids 23(1-3): 153-159, 2002.

SKOLNICK P, LAYER RT, POPIK P, NOWAK G, PAUL IA, TRULLAS R. Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. Pharmacopsychiatry 29(1): 23-26, 1996.

SKOLNICK P, POPIK P, JANOWSKY A, BEER B, LIPPA AS. "Broad spectrum" antidepressants: is more better for the treatment of depression? Life Sci 73(25): 3175-3179, 2003.

SKOLNICK P, POPIK P, TRULLAS R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. Trends Pharmacol Sci 30(11): 563-569, 2009.

SLATTERY DA, NEUMANN ID, CRYAN JF. Transient inactivation of the infralimbic cortex induces antidepressant-like effects in the rat. J Psychopharmacol 25(10): 1295-1303, 2011.

SORRELLS SF, CASO JR, MUNHOZ CD, SAPOLSKY RM. The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation. Neuron 64(1): 33-39, 2009.

STONE EA. A final common pathway for depression: implications for therapy. Expert Opin Ther Targets 11(8): 1019-1032, 2007.

TAKAHASHI T, YUCEL M, LORENZETTI V, TANINO R, WHITTLE S, SUZUKI M, *et al.* Volumetric MRI study of the insular cortex in individuals with current and past major depression. J Affect Disord 121(3): 231-238, 2010.

TAVARES RF, RESSTEL LB, CORREA FM. Interaction between glutamatergic and nitrenergic mechanisms mediating cardiovascular responses to L-glutamate injection in the diagonal band of Broca in anesthetized rats. Life Sci 81(10): 855-862, 2007.

TORDERA RM, TOTTERDELL S, WOJCIK SM, BROSE N, ELIZALDE N, LASHERAS B, *et al.* Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). Eur J Neurosci 25(1): 281-290, 2007.

TRECCANI G, MUSAZZI L, PEREGO C, MILANESE M, NAVA N, BONIFACINO T, *et al.* Acute stress rapidly increases the readily releasable pool of glutamate vesicles in prefrontal and frontal cortex through non-genomic action of corticosterone. Mol Psychiatry 19(4): 401, 2014.

TRULLAS R, SKOLNICK P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. Eur J Pharmacol 185(1): 1-10, 1990.

ULAK G, MUTLU O, TANYERI P, KOMSUOGLU FI, AKAR FY, ERDEN BF. Involvement of serotonin receptor subtypes in the antidepressant-like effect of TRIM in the rat forced swimming test. Pharmacol Biochem Behav 95(3): 308-314, 2010.

VAN DER STAAY FJ. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. Brain research reviews 52(1): 131-159, 2006.

VERTES RP. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. Synapse 51(1): 32-58, 2004.

VERTES RP. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neuroscience 142(1): 1-20, 2006.

VIDAL-GONZALEZ I, VIDAL-GONZALEZ B, RAUCH SL, QUIRK GJ. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. Learn Mem 13(6): 728-733, 2006.

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(1-2): 141-147, 2003.

VOLKE V, WEGENER G, VASAR E, ROSENBERG R. Methylene blue inhibits hippocampal nitric oxide synthase activity in vivo. Brain Res 826(2): 303-305, 1999.

WANG JQ, TANG Q, PARELKAR NK, LIU Z, SAMDANI S, CHOE ES, *et al.* Glutamate signaling to Ras-MAPK in striatal neurons: mechanisms for inducible gene expression and plasticity. Molecular neurobiology 29(1): 1-14, 2004a.

WANG SJ, WANG KY, WANG WC. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). Neuroscience 125(1): 191-201, 2004b.

WEGENER G, VOLKE V, HARVEY BH, ROSENBERG R. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. Brain Res 959(1): 128-134, 2003.

WEGENER G, VOLKE V, ROSENBERG R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. Br J Pharmacol 130(3): 575-580, 2000.

WURTMAN RJ. Genes, stress, and depression. Metabolism 54(5 Suppl 1): 16-19, 2005.

YAMADA K, MIZUNO M, NABESHIMA T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. Life Sci 70(7): 735-744, 2002.

YAMADA K, NABESHIMA T. Changes in NMDA receptor/nitric oxide signaling pathway in the brain with aging. Microsc Res Tech 43(1): 68-74, 1998.

YANG C, HU YM, ZHOU ZQ, ZHANG GF, YANG JJ. Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. Upsala journal of medical sciences 118(1): 3-8, 2013.

YAZIR Y, UTKAN T, ARICIOGLU F. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase prevents depression-like behaviour in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. Basic & clinical pharmacology & toxicology 111(3): 154-160, 2012.

YILDIZ F, ERDEN BF, ULAK G, UTKAN T, GACAR N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. Psychopharmacology (Berl) 149(1): 41-44, 2000.

YOON SC, SEO MS, KIM SH, JEON WJ, AHN YM, KANG UG, *et al*. The effect of MK-801 on mTOR/p70S6K and translation-related proteins in rat frontal cortex. Neurosci Lett 434(1): 23-28, 2008.

YU H, CHEN ZY. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. Acta Pharmacol Sin 32(1): 3-11, 2011.

YU H, WANG Y, PATTWELL S, JING D, LIU T, ZHANG Y, *et al*. Variant BDNF Val66Met polymorphism affects extinction of conditioned aversive memory. J Neurosci 29(13): 4056-4064, 2009.

ZARATE CA, JR., BRUTSCHE NE, IBRAHIM L, FRANCO-CHAVES J, DIAZGRANADOS N, CRAVCHIK A, *et al*. Replication of ketamine's antidepressant efficacy in bipolar depression: a randomized controlled add-on trial. Biol Psychiatry 71(11): 939-946, 2012.

ZARATE CA, JR., DU J, QUIROZ J, GRAY NA, DENICOFF KD, SINGH J, *et al*. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. Ann N Y Acad Sci 1003: 273-291, 2003.

ZARATE CA, JR., PAYNE JL, QUIROZ J, SPORN J, DENICOFF KK, LUCKENBAUGH D, *et al*. An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression. Am J Psychiatry 161(1): 171-174, 2004.

ZARATE CA, JR., QUIROZ JA, SINGH JB, DENICOFF KD, DE JESUS G, LUCKENBAUGH DA, *et al*. An open-label trial of the glutamate-modulating agent riluzole in combination with lithium for the treatment of bipolar depression. Biol Psychiatry 57(4): 430-432, 2005.

ZARATE CA, JR., SINGH JB, CARLSON PJ, BRUTSCHE NE, AMELI R, LUCKENBAUGH DA, *et al*. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. Arch Gen Psychiatry 63(8): 856-864, 2006.

ZHANG B, KNIGHT KR, DOWSING B, GUIDA E, PHAN LH, HICKEY MJ, *et al*. Timing of administration of dexamethasone or the nitric oxide synthase inhibitor, nitro-L-

arginine methyl ester, is critical for effective treatment of ischaemia-reperfusion injury to rat skeletal muscle. Clin Sci (Lond) 93(2): 167-174, 1997.

ZHANG GF, WANG N, SHI JY, XU SX, LI XM, JI MH, *et al.* Inhibition of the l-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. Pharmacol Biochem Behav 110C: 8-12, 2013.

ZHANG J, HUANG XY, YE ML, LUO CX, WU HY, HU Y, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT_{1A} receptor in modulating anxiety-related behaviors. J Neurosci 30(7): 2433-2441, 2010.

ZHOU QG, HU Y, HUA Y, HU M, LUO CX, HAN X, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. J Neurochem 103(5): 1843-1854, 2007.

ZHOU W, WANG N, YANG C, LI XM, ZHOU ZQ, YANG JJ. Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. Eur Psychiatry 29(7): 419-423, 2014.

ANEXO 1

University of São Paulo
School of Medicine of Ribeirão Preto
Departament of Farmacology

Final Report BEPE - 2013

**Involvement of BDNF-TrkB-mTOR pathway in the antidepressant-like effect
induced by NOS inhibitors**

PhD Student: Vitor Silva Pereira

Advisor: Prof. Dra. Sâmia R.L. Joca.

Colaborator: Dr. Gregers Wegener

Ribeirão Preto – SP

2013

1. Initial Plan

The glutamatergic system has been recently implicated in the neurobiology of depression (Sanacora et al., 2012). For instance, treatment with ketamine, an ionotropic glutamatergic NMDA receptor (NMDAr) antagonist, induces rapid and sustained antidepressant effects in humans and in animal models (Li et al., 2010). These data suggests that the glutamatergic neurotransmission may be a promising alternative target for the development of more effective drugs to treat depression compared to the monoaminergic based drugs, since the later require chronic administration to induce a significant therapeutic effect (Sanacora et al., 2012).

The investigation of the underlying cellular and molecular mechanisms involved in ketamine-induced antidepressant effects have shown that it rapidly activates intracellular pathways involved in neural plasticity, leading to increased synaptic signaling proteins and increased number and function of new spine synapses in the prefrontal cortex and/or the hippocampus (Li et al., 2010, Autry et al., 2011). These effects are thought to be mediated by the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the medial prefrontal cortex (MPFC) (Li et al., 2010) and by rapid expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus (Autry et al., 2011). BDNF itself may regulate mTOR activity through the activation of its receptor, TrkB, which in turn activates PI3K and Akt, proteins involved with the regulation of mTOR activity (Hoeffler and Klann, 2010). However, the precise mechanisms linking NMDAr blockade to BDNF and mTOR regulation are not entirely clear.

The activation of NMDA receptors can evoke the release of nitric oxide (NO) in the brain in response to calcium influx and subsequent activation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Several pieces of evidence have shown that treatment with nNOS inhibitors induces antidepressant-like effects in animal models (Dhir and Kulkarni, 2011).

The behavioral effects of nNOS inhibitors are accompanied by increased expression of BDNF in the hippocampus (Joca et al., 2007, Yazir et al., 2012) and inhibition of NMDAr or nNOS in the hippocampus induces antidepressant-like effects in the forced swimming test (FST) (Padovan and Guimaraes, 2004, Joca and Guimaraes, 2006). Therefore, it is possible that NO may be a signaling mechanism downstream the NMDAr regulating BDNF-TrkB expression/activity.

The administration of NMDAr antagonist or nNOS inhibitor into the ventral MPFC (vMPFC) is also able to induce antidepressant-like effect in rats submitted to the FST (Pereira and Joca, *unpublished*) and the antidepressant-like effect induced by systemic injection of NMDAr antagonist is mediated by mTOR activation in the MPFC (Li et al., 2010). Despite the aforementioned evidence, it is not yet known whether the antidepressant-like effect induced by nNOS inhibitors would involve the modulation of the BDNF-TrkB-mTOR pathway in the MPFC.

Therefore, the aim of this work was to test the hypothesis that the antidepressant-like effects induced by inhibition of NO synthesis would involve the modulation of BDNF levels in the ventral MPFC, with subsequent activation of its receptor, TrkB, and mTOR. Those were investigated by means of analysis of gene expression in the MPFC of rats treated with Ketamine or 7-NI (nNOS inhibitor) and submitted to animal models of depression. The signaling from TrkB regulating mTOR activity were also analyzed through the levels of their mRNA. Additionally to 7-NI, we also investigated the effects induced by systemic treatment with aminoguanidine (AMG), an iNOS inhibitor which has shown an antidepressant-like profile in the forced swimming test (Montezuma et al, 2011), associated to increased levels of BDNF in the MPFC and in the hippocampus (Biojone et al., *unpublished*).

Finally, we investigated whether the pathway BDNF-TrkB-mTOR in the MPFC is necessary for the antidepressant-like effect induced by NOS inhibitors.

2. Summary of developed activities

2.1 Summary of experiments and results

During the period of April 25th and August 24th the PhD Student, Vitor Silva Pereira, went to Aarhus – Denmark to develop the BEPE project at the laboratory of professor Dr. Gregers Wegener at the University of Aarhus. The experiments and results are summarized below:

The experiments developed were designed to evaluate the effects of glutamatergic blockade and nitroergic inhibition over the behavioural response and gene expression (MPFC - mTOR and TrkB) of Wistar, Sprague-Dawley (SD) and Flinders Sensitive Line(FSL)/Flinders Resistant Line(FRL) rats exposed to the FST.

Initially, we started with the Wistar rats, but this strain showed some problems during the development of the experiments. The animals were not responding properly to the drugs, not even to the positive control. The first set of experiments with Wistar rats took 3 weeks, so given the fact we could not find out why the animals were not responding to the experimental conditions, we then decided to change the strain of animals to Sprague Dawley rats.

Therefore, we developed three set of experiments to evaluate the systemic glutamatergic blockade or nitroergic inhibition over the behaviour and gene expression of SD rats. The experiments are described below:

- The SD rats were exposed to the pre-test session of FST and 23h later they were injected with Ketamine, 7-NI, Aminoguanidine or Imipramine. After 1h

they were exposed to the test session and 1h later the tissue samples were dissected;

- The SD rats were exposed to the pre-test session of FST and 23h later they were injected with Ketamine, 7-NI or Aminoguanidine. After 2h the tissue samples were dissected;
- The SD rats were injected with Ketamine, 7-NI or Aminoguanidine and after 2h the tissue samples were dissected.

The behavioural effects show that Ketamine (15mg/kg) and Aminoguanidine (60mg/kg) were capable of inducing an antidepressant-like effect, but 7-NI (30mg/kg) did not induced any change in the behaviour of the animals. The results of gene expression to mTOR and TrkB, into the MPFC, still under analysis and all the samples were properly collected.

Considering the FSL/FRL rats, a similar set of experiments was developed, but only one experiment with these animals was realized. The experiment is described bellow:

- The FSL/FRL rats were exposed to the pre-test session of FST and 23h later they were injected with Ketamine or Aminoguanidine. After 1h they were exposed to the test session and 1h later the tissue samples were dissected.

The behavioural effects show that Ketamine (15mg/kg) and Aminoguanidine (60mg/kg) were capable of inducing an antidepressant-like effect. The results of gene expression to mTOR and TrkB, into the MPFC, still under analysis and all the samples were properly collected.

Finally, so far the results go in line with the project hypothesis and sustain the development of the following steps of the regular project.

2.2 Summary of developed activities

From May 3rd to 4th the student participated of 01 international congress, the 54th Annual Congress of SCNP. During the congress a poster was presented, which title was NMDA antagonist, but not nNOS inhibitor, requires ampa receptors in the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) to induce antidepressant-like effects. The abstract of the presented work was published on the congress annals (ANNEX 1).

One abstract was submitted and accepted to be presented as a poster at the 45th meeting of the European Brain and Behaviour Society (EBBS – September 6th to 9th). The title of the poster was Cortical bdnf – trkb – mtor pathway role in the behavioral response to forced swim stress exposition (ANNEX 2).

A scientific paper has been written and is in the final step of correction, which contains results from the regular PhD project.

3. Material and Methods

Animals: Male Wistar rats, (270-300 g), Male Sprague-Dawley rats (270-300 g), Male Flinders Sensitive Line rats (230-260 g), Male Flinders Resistant Line rats (230-260 g).

Drugs: ketamine (10 mg/Kg) (Li et al., 2010); 7-nitroindazole (7-NI, nNOS inhibitor: 30 mg/Kg) (Silva et al., 2012); Aminoguanidine (iNOS inhibitor: 75 mg/Kg) (Montezuma et al., 2012); k252a (Trk antagonist: 10 pmol/0.2 uL/side) (Casarotto et al., 2010); rapamicin (mTOR inhibitor: 0.2 nmol/0.2 uL/side) (Li et al., 2010).

Experimental paradigm: behavioral procedures for the FST were performed as described before (Silva et al., 2012).

Gene analysis: Immediately after the pretest or the test session, the animals were killed by stunning and decapitation, in order to have brain areas of interest (medial prefrontal cortex) dissected and stored for posterior quantification of TrkB, mTOR, mRNA expression determination by qRT-PCR, as described in previous studies (Bonefeld et al., 2008, Elfving et al., 2008, Elfving et al., 2010, Elfving and Wegener, 2012)

Experimental Design:

Effects of systemic injection of NMDA antagonist or NOS inhibitors on TrkB and mTOR gene expression in the MPFC of Sprague-Dawley rats submitted to the forced swim test:

Protocol 1: The animals were exposed to pretest and test sessions of forced swim. One hour before the test they received the i.p. injection of ketamine, 7-NI, aminoguanidine, imipramine or vehicle. One hour after the test session the animals were sacrificed, the MPFC was dissected and stored at -80°C for further analysis of gene expression as previously described (qRT-PCR).

Protocol 2: The animals were exposed to pretest session of forced swim. Twenty-three hour after they received the i.p. injection of ketamine, 7-NI, aminoguanidine or vehicle. Two hour after the injection the animals were sacrificed, the MPFC was dissected and stored at -80°C for further analysis of gene expression as previously described (qRT-PCR).

Protocol 3: The animals received the i.p. injection of ketamine, 7-NI, aminoguanidine or vehicle. Two hour after the injection the animals were sacrificed, the MPFC was dissected and stored at -80°C for further analysis of gene expression as previously described (qRT-PCR).

Effects of systemic injection of NMDA antagonist or NOS inhibitors on TrKB and mTOR gene expression in the MPFC of FSL/FRL rats submitted to the forced swim test:

The animals were exposed to pretest and test sessions of forced swim. One hour before the test they received the i.p. injection of ketamine, aminoguanidine or vehicle. One hour after the test session the animals were sacrificed, the MPFC was dissected and stored at -80°C for further analysis of gene expression as previously described (qRT-PCR).

5. Statistical Analysis

The results were analysed by one-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

6. Results

Effects of systemic injection of NMDA antagonist or NOS inhibitors on TrKB and mTOR gene expression in the MPFC of Sprague-Dawley rats submitted to the forced swim test:

The systemic injection of ketamine (15 mg/kg), aminoguanidine (60 mg/kg) and imipramine (positive control – 3 injections: 0, 5 and 23h after pre-test; 15 mg/kg) were capable of significantly reduce the immobility time of the animals. The systemic injection of 7-NI did not induced any change on the behavioural response of the animals (Mean $\pm$ SEM: vehicle: 267.8 ± 5.877 ; ketamine: $163.0 \pm 29.30^*$; aminoguanidine: $160.7 \pm 18.59^*$; imipramine: $143.0 \pm 22.30^*$; 7-NI: 216.2 ± 26.57 ; $F_{(4,28)} = 4.689$; $*p < 0.05$, Dunnett) (Figure 1).

The samples of MPFC collected to run the gene expression of BDNF and mTOR showed that any of the treatments was capable of changing the expression of the genes analysed in any of the experimental settings utilized (Figures 2 to 7).

Figure 1 Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) , 7-NI (30 mg/Kg), Aminoguanidine (60 mg/Kg) 1h before the test, or imipramine (3 injections: 0, 5 and 24h after pre-test; 15 mg/Kg), over the immobility time of Sprague-Dawley rats exposed to the forced swim test . Mean $\pm$ SEM, * $p < 0,05$ (Dunnett).

Figure 2 Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) , 7-NI (30 mg/Kg), Aminoguanidine (60 mg/Kg) 1h before the test, or imipramine (3 injections: 0, 5 and 24h after pre-test; 15 mg/Kg), over the gene expression of BDNF in the MPFC punch, collected 1h after the test session, of Sprague-Dawley rats exposed to the forced swim test. Mean $\pm$ SEM, $p > 0,05$ (Dunnett).

Figure 3 Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) , 7-NI (30 mg/Kg), Aminoguanidine (60 mg/Kg) 1h before the test, or imipramine (3 injections: 0, 5 and 24h after pre-test; 15 mg/Kg), over the gene expression of mTOR in the MPFC punch, collected 1h after the test session, of Sprague-Dawley rats exposed to the forced swim test. Mean $\pm$ SEM, $p > 0,05$ (Dunnett).

Figure 4 Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) , 7-NI (30 mg/Kg), Aminoguanidine (60 mg/Kg) 23h after the pretest, over the gene expression of BDNF in the MPFC punch, collected 2h after the drug injection, of Sprague-Dawley rats. Mean $\pm$ SEM, $p > 0,05$ (Dunnett).

Figure 5 Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) , 7-NI (30 mg/Kg), Aminoguanidine (60 mg/Kg) 23h after the pretest, over the gene expression of mTOR in the MPFC punch, collected 2h after the drug injection, of Sprague-Dawley rats. Mean $\pm$ SEM, $p > 0,05$ (Dunnett).

Figure 6 Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) , 7-NI (30 mg/Kg), Aminoguanidine (60 mg/Kg) over the gene expression of BDNF in the MPFC punch, collected 2h after the drug injection, of Sprague-Dawley rats. Mean $\pm$ SEM, $p > 0,05$ (Dunnett).

Figure 7 Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) , 7-NI (30 mg/Kg), Aminoguanidine (60 mg/Kg) over the gene expression of mTOR in the MPFC punch, collected 2h after the drug injection, of Sprague-Dawley rats. Mean $\pm$ SEM, $p > 0,05$ (Dunnett).

Effects of systemic injection of NMDA antagonist or NOS inhibitors on TrKB and mTOR gene expression in the MPFC of FSL/FRL rats submitted to the forced swim test:

test:

The systemic injection of ketamine (15 mg/kg) or aminoguanidine (60 mg/kg) were capable of significantly reduce the immobility time of the animals. ($F_{(2,21)} = 6.678$; $*p < 0.05$, Dunnett) (Figure 2). The FRL rats also shown a significantly reduced the immobility time when compared to the FSL controls. (Mean $\pm$ SEM: FSL vehicle: 245.7 ± 16.78 ; FRL vehicle: $106.9 \pm 12.14^{\#}$; $t_{(13)} = 6.828$; $^{\#}p < 0.05$, Student's T test) (Figure 2)

The samples of MPFC collected to run the gene expression of BDNF and mTOR showed that in the FSL rats the treatment with ketamine was capable of enhance the gene expression of BDNF ($F_{(3,24)} = 4.665$, $*p < 0.05$, Dunnett) (Fig.10), but not of mTOR (Fig. 10). Aminoguanidine did not induce any changes in the expression of analysed genes (Fig 9 and 10).

Figure 8. Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) or Aminoguanidine (60 mg/Kg) 1h before the test, over the immobility time of FSL/FRL rats exposed to the forced swim test. Mean $\pm$ SEM; # $p < 0,05$ (T test); * $p < 0,05$ (Dunnett).

Figure 9. Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) or Aminoguanidine (60 mg/Kg) 1h before the test, over the gene expression of BDNF in the MPFC punch, collected 1h after the test session, of FSL/FRL rats exposed to the forced swim test. Mean $\pm$ SEM; * $p < 0,05$ (Dunnett).

Figure 10. Effects of acute systemic injection of vehicle, Ketamine (15 mg/Kg) or Aminoguanidine (60 mg/Kg) 1h before the test, over the gene expression of mTOR in the MPFC punch, collected 1h after the test session, of FSL/FRL rats exposed to the forced swim test. Mean $\pm$ SEM; $p > 0,05$ (Dunnett).

7. Discussion

The results show that the systemic injections of NMDAR antagonists or NOS inhibitors are capable of inducing an antidepressant-like effect on Sprague-Dawley (SD) rats. Ketamine (15 mg/Kg) and Aminoguanidine (60 mg/Kg), when injected 1h before the FST test session, reduced the immobility time of the SD rats, but 7-NI was not capable of inducing any change on the behaviour of the animals. Considering the FSL rats, the same drugs at the same doses were also capable of induce an antidepressant-like effect. The PCR analyses show that in the SD rats any of the treatments was capable of changing the BDNF or mTOR gene expression, but in the FSL rats the treatment with ketamine enhanced the expression of BDNF gene.

Regarding the group treated with 7-NI (selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase) the results deserve some important observations. The data obtained with this drug in this project was unexpected, since this drug has been widely used in the forced swim test by our group and by others (Yildiz et al., 2000, Harkin et al., 2004, Joca and Guimaraes, 2006). However, this compound is difficult to work because the solutions are not easy to handle and this fact might play an important role on the drug effect. Therefore, since we could not find satisfactory results with 7-NI when given to the SD rats, we decided to do not use this drug on the FSL rats.

The forced swim test is widely used to analyses animal of behaviour, mainly to identify drugs with potential antidepressive-like effect (O'Neil and Moore, 2003, McArthur and Borsini, 2006). This model consists on putting the rats in a cylinder filled with water, thus promoting a situation of inescapable stress. After an initial period where the rat tries to scape there is a predominant behaviour of immobility, which is reduced on animals treated with antidepressants (Porsolt et al., 1977, Porsolt et al., 2001, O'Neil and Moore, 2003). With the FST it was already demonstrated that classical, atypical and even

the newest antidepressants (McArthur and Borsini, 2006), like ketamine (Li et al., 2010), can reduce the immobility time of rats exposed to the FST. Beyond that, the low cost profile, easy execution and mild stress profile, give to the FST an advantage to the FST over other kinds of behavioural tests, which might involve electrical shocks and complicated paradigms of execution (O'Neil and Moore, 2003).

The Flinders Sensitive Line rats is considered a genetic model of depression because these animals show a spontaneous depressive-like behaviour in several models of behaviour analyses (Overstreet and Wegener, 2013). Considering studies about depression, the FSL have shown to be an interesting tool to better understand this pathology. Several studies worldwide, show that these rats answer chronically and acutely to different antidepressant drugs when exposed to the FST (Overstreet and Wegener, 2013). Interestingly, recent data show that the FSL have a disrupted functioning of glutamatergic and nitrergic systems into the central nervous system, then reinforcing the correlation between glutamate/NO dysfunction and a depressed phenotype (Wegener et al., 2010). Therefore, our results address new knowledge about the FSL answer to new antidepressant drugs once we show that these animals show an antidepressive-like behaviour when treated with ketamine and aminoguanidine. This data also corroborates the participation of glutamatergic and nitrergic systems on depressed phenotypes, thus helping to better understand the development of behavioural pathologies, like depression.

The activation of NMDA receptors promotes an increase in the activation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and, consequently, an increased production of NO (Garthwaite et al., 1989). It was already demonstrated the diverse physiological actions of NO in mechanisms of memory, where animal studies show that the reduction of basal levels of NO impairs memory formation (Yamada and Nabeshima, 1998, Guix et al., 2005). NO also participates on the modulation of mood, with evidence suggesting that

high levels of NO has pro-depressive effect (Harkin et al., 1999, Joca and Guimaraes, 2006, Joca et al., 2007), in neural plasticity and in the control mechanisms apoptosis (a mechanism of neural plasticity) (Akaike et al., 1999, Guix et al., 2005). In pathological situations, or when in excess, NO may have adverse effects and thus trigger cell death processes (Pryor et al., 2006).

Chronic administration of methylene blue, an inhibitor of NOS and soluble guanylate cyclase (Volke et al., 1999) demonstrated in a clinical study to have significant antidepressant effect (Naylor et al., 1987). Subsequently, Jefferys and Funder (1996) conducted experiments to investigate the possible involvement of NO in depression and demonstrated that intraperitoneal administration of non-selective inhibitor of NOS enzymes induces antidepressant-like effect in the FST (Jefferys and Funder, 1996). Recent studies have emphasized the role of NO in depression, where through behavioural models, such as the FST and chronic stress, the antidepressant-like effects produced by inhibition of NO were corroborated (Yildiz et al., 2000, Joca and Guimaraes, 2006, Zhou et al., 2007). These studies support the hypothesis that the blockade of NMDA pathway can induce antidepressant-like effects by reducing the formation of NO in the CNS. Then, considering the data reported here, the hypothesis is supported and reinforces the participation of NMDA/NO mechanisms on a constitutively depressed behaviour.

Beyond that, there is another interesting factor that might link the NMDA/NO pathway with the behavioural consequences of stress. BDNF is the most expressed neurotrophin in the CNS and its actions are mediated mainly through the activation of the tyrosine kinase B receptor (TrkB), regulating the activation of important intracellular pathways, such as the PI3K-Akt-mTOR and of transcription factors like the CREB protein (Chen et al., 2009, Martin and Finsterwald, 2011, Nagahara and Tuszynski, 2011). Interestingly, NMDAR antagonists depend of BDNF to develop antidepressant-like

effects (Autry et al., 2011) and can enhance BDNF levels into CNS (Ricci et al., 2011, Mathews et al., 2012). The inhibition of mTOR, into the ventral medial prefrontal cortex, can also abolish the fast antidepressant-like effects of NMDA antagonists (Li et al., 2010). At the same way, NO inhibitors can reverse the reduction of BDNF into CNS after chronic stress (Yazir et al., 2012). Stressed rats and FSL rats also show disturbances on BDNF levels into the CNS (Elfving et al., 2010, Yazir et al., 2012), which reinforce the role of this neurotrophin over behavioral control. Therefore, our experiments measuring the gene expression of BDNF and mTOR, into the MPFC, gives new insights into the relation of NMDA antagonists, NO inhibitors and BDNF-TrKB-mTOR pathway activation in animals exposed to stress and phenotypically depressed. The results with SD rats do not confirm the results of the literature, but we can consider this difference might be given as we analyzed the gene expression and not protein expression. However, with the FSL rats there was an enhancement of BDNF gene expression after ketamine treatment, which goes in line with the literature and might indicate that ketamine works better in animals that are already with a depressed phenotype.

Finally, our results here presented provide new interesting points to the understanding of how new antidepressant drugs act over the behavioral response of stressed animals. Furthermore, the development of BEPE also brings new important information to the regular Phd project under development and reinforces the collaboration between our group at FMRP/USP-Ribeirão Preto and the group of the professor Gregers Wegener at the University of Aarhus-DK.

8. References

Akaike A, Katsuki H, Kume T, Maeda T (1999) Reactive oxygen species in NMDA receptor-mediated glutamate neurotoxicity. *Parkinsonism Relat Disord* 5:203-207.

- Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM (2011) NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*.
- Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G (2008) Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. *Synapse* 62:302-309.
- Casarotto PC, de Bortoli VC, Correa FM, Resstel LB, Zangrossi H, Jr. (2010) Panicolytic-like effect of BDNF in the rat dorsal periaqueductal grey matter: the role of 5-HT and GABA. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:573-582.
- Chen TJ, Wang DC, Chen SS (2009) Amyloid-beta interrupts the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway that could be involved in brain-derived neurotrophic factor-induced Arc expression in rat cortical neurons. *J Neurosci Res* 87:2297-2307.
- Dhir A, Kulkarni SK (2011) Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide* 24:125-131.
- Elfving B, Bonefeld BE, Rosenberg R, Wegener G (2008) Differential expression of synaptic vesicle proteins after repeated electroconvulsive seizures in rat frontal cortex and hippocampus. *Synapse* 62:662-670.
- Elfving B, Plougmann PH, Muller HK, Mathe AA, Rosenberg R, Wegener G (2010) Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:563-572.
- Elfving B, Wegener G (2012) Electroconvulsive seizures stimulate the vegf pathway via mTORC1. *Synapse* 66:340-345.
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172:413-416.
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76:126-152.
- Harkin A, Connor TJ, Burns MP, Kelly JP (2004) Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* 14:274-281.
- Harkin AJ, Bruce KH, Craft B, Paul IA (1999) Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol* 372:207-213.
- Hoeffler CA, Klann E (2010) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33:67-75.
- Jefferys D, Funder J (1996) Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol* 295:131-135.

- Joca SR, Ferreira FR, Guimaraes FS (2007) Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrergic neurotransmitter systems. *Stress* 10:227-249.
- Joca SR, Guimaraes FS (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)* 185:298-305.
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2010) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329:959-964.
- Martin JL, Finsterwald C (2011) Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. *Commun Integr Biol* 4:14-16.
- Mathews DC, Henter ID, Zarate CA (2012) Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. *Drugs* 72:1313-1333.
- McArthur R, Borsini F (2006) Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav* 84:436-452.
- Montezuma K, Biojone C, Lisboa SF, Cunha FQ, Guimaraes FS, Joca SR (2012) Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacology* 62:485-491.
- Nagahara AH, Tuszynski MH (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10:209-219.
- Naylor GJ, Smith AH, Connelly P (1987) A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. *Biol Psychiatry* 22:657-659.
- O'Neil MF, Moore NA (2003) Animal models of depression: are there any? *Hum Psychopharmacol* 18:239-254.
- Overstreet DH, Wegener G (2013) The flinders sensitive line rat model of depression--25 years and still producing. *Pharmacol Rev* 65:143-155.
- Padovan CM, Guimaraes FS (2004) Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77:15-19.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.
- Porsolt RD, Brossard G, Hautbois C, Roux S (2001) Rodent models of depression: forced swimming and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8:Unit 8 10A*.

- Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ (2006) Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R491-511.
- Ricci V, Martinotti G, Gelfo F, Tonioni F, Caltagirone C, Bria P, Angelucci F (2011) Chronic ketamine use increases serum levels of brain-derived neurotrophic factor. *Psychopharmacology (Berl)* 215:143-148.
- Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62:63-77.
- Volke V, Wegener G, Vasar E, Rosenberg R (1999) Methylene blue inhibits hippocampal nitric oxide synthase activity in vivo. *Brain Res* 826:303-305.
- Wegener G, Harvey BH, Bonefeld B, Muller HK, Volke V, Overstreet DH, Elfving B (2010) Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:461-473.
- Yamada K, Nabeshima T (1998) Changes in NMDA receptor/nitric oxide signaling pathway in the brain with aging. *Microsc Res Tech* 43:68-74.
- Yazir Y, Utkan T, Aricioglu F (2012) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase prevents depression-like behaviour in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 111:154-160.
- Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N (2000) Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 149:41-44.
- Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY (2007) Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 103:1843-1854.

ANNEX 1

European Union of Medical Specialists
EACCME - European Accreditation Council for Continuing Medical Education
Institution of the UEMS
Avenue de la Couronne 20, B-1050, Brussels
T: +32 2 649 5164 | F: +32 2 640 37 30 | E: accreditation@uems.net

Scandinavian College of Neuropsychopharmacology

SUBJECT: EACCME accreditation granted EACCME-9010-G

We are pleased to inform you that your application for European accreditation for:

54th Annual meeting of the SCNPP

Venue: Copenhagen, Denmark (2.-4.05.2013)

Event code: 9010

was granted **14** European CME credits (ECMEC) by the European Accreditation Council for Continuing Medical Education (EACCME).

European Accreditation

European Accreditation is granted by the EACCME in order to allow participants who attend the above-mentioned activity to validate their credits in their own country.

Accreditation Statement

Accreditation by the EACCME confers the right to place the following statement in all communication materials including the registration website, the event programme and the certificate of attendance. The following statements must be used without revision:

»The 'Scandinavian College of Neuropsychopharmacology' (or '54th Annual meeting of the SCNPP' is accredited by the European Accreditation Council for Continuing Medical Education (EACCME) to provide the following CME activity for medical specialists. The EACCME is an institution of the European Union of Medical Specialists (UEMS), www.uems.net.«

»The '54th Annual meeting of the SCNPP' is designated for a maximum of (or 'for up to') 14 hours of European external CME credits. Each medical specialist should claim only those hours of credit that he/she actually spent in the educational activity.«

»Through an agreement between the European Union of Medical Specialists and the American Medical Association, physicians may convert EACCME credits to an equivalent number of AMA PRA Category 1 Credits™. Information on the process to convert EACCME credit to AMA credit can be found at www.ama-assn.org/go/internationalcme.«

»Live educational activities, occurring outside of Canada, recognized by the UEMS-EACCME for ECMEC credits are deemed to be Accredited Group Learning Activities (Section 1) as defined by the Maintenance of Certification Program of The Royal College of Physicians and Surgeons of Canada.«

EACCME credits

Each medical specialist should claim only those hours of credit that he/she actually spent in the educational activity. The EACCME credit system is based on 1 ECMEC per hour with a maximum of 3 ECMECs for half a day and 6 ECMECs for a full-day event.

Logo

The UEMS – EACCME logo is a service mark of the European Union of Medical Specialists – European Accreditation Council for CME. This service mark may be used publicly only with the permission of the UEMS – EACCME. The logo may only be used in conjunction with, and in proximity to, the EACCME accreditation statement. The logo cannot be used in notices, advertising, or promotion of activities other than in association with the EACCME accreditation statement.

Feedback report

The EACCME requires you to provide a feedback report of the event within four weeks of its completion together with a copy of the list of participants and the results of the individual feedback assessments by participants.

Brussels, 10. 4. 2013 The UEMS – EACCME Secretariat

UEMS - Union européenne des médecins spécialistes | Avenue de la Couronne 20, B-1050, Bruxelles

IBAN BE28 0001 3283 3820 | BIC (SWIFT) code: BPOTBEB1

The European Accreditation Council for Continuing Medical Education (EACCME) was set up by the UEMS for the purpose of ensuring the international mutual recognition of quality assessments of CME-CPD activities organised all over the world for the benefit of European physicians

ANNEX 2

CORTICAL BDNF – TRKB – mTOR PATHWAY ROLE IN THE BEHAVIORAL RESPONSE TO FORCED SWIMM STRESS EXPOSITION

Vitor Silva Pereira^{1,*}; Angélica Caroline Romano², Sâmia R.L. Joca²

¹Department of Farmacology, Medicine School of Ribeirão Preto; ²Pharmacy School of Ribeirão Preto; University de São Paulo – USP, Ribeirão Preto – SP, Brazil. ³Department of Clinical Medicine, Centre for Psychiatric Research – Aarhus University.

The exposition to stressful events decreases the BDNF levels, which is related with atrophy and lower activity of limbic structures. Moreover, clinical data show that treatment with antidepressants is capable to normalize serum levels of BDNF. Recent data show that treatment with NMDA antagonists increases the levels of BDNF, directly related with the antidepressant effect of these drugs. BDNF activates important intracellular pathways through its receptor TrkB, such PI3K-Akt-mTOR pathway and it was shown that cortical mTOR blockade is capable to abolish the antidepressant-like effects of the NMDA antagonist, ketamine. The aim of the present study was to evaluate the participation of the BDNF neurotransmission of the vmPFC on the behavioral consequences induced by forced swimming (FS), an animal model of depression. Male Wistar rats (240-280g) with guide cannulas aimed at the prelimbic (PL) region of vmPFC were submitted to a 15min session of FS and, 24h later, they were submitted to a 5min session of the FS test when the immobility time (IT) was measured. Firstly, the animals received an injection of BDNF (0.1 or 0.2nmol/0.2µL) or vehicle. Secondly, in an independent group an injection of K252a (TrkB antagonist at 0.01nmol/0.2µL) or vehicle was realized 10 min before BDNF (0.2nmol/0.2µL) or vehicle. Finally, in an independent group an injection of Rapamycin (RAPA - mTOR inhibitor at 0.2nmol/0.2µL) or DMSO was realized 10 min before BDNF (0.2nmol/0.2µL) or vehicle. The animals were exposed to the test session 30 min after the last injection. All data were analyzed by ANOVA followed by Dunnett post-hoc test. BDNF administration into vmPFC-PL reduced the IT (Mean±SEM: vehicle: 203.0±17.41; BDNF 0.1nmol: 129.0±22.28; BDNF 0.2nmol: 38.14±16.65*; $F_{(2,15)}= 21.67$; * $p<0.05$). K252a did not reduce the IT per se but it abolished the effects of BDNF in the FST (Mean±SEM: vehicle+vehicle: 177.1±18.29; vehicle+BDNF: 66.33±24.58*; K252a+vehicle: 156.2±23.65; K252a+BDNF: 173.1±24.76; $F_{(3,22)}= 5.119$; * $p<0.05$; Dunnett). The effect of BDNF was also blocked by RAPA pre-treatment (Mean±SEM: DMSO+vehicle: 213.5±16.62; DMSO+BDNF: 31.29±3.517*; RAPA+vehicle: 182.4±4.781; RAPA+BDNF: 175.3±22.77; $F_{(3,25)}= 29.03$; * $p<0.05$; Dunnett). Our present data shows that BDNF, through TrkB receptor, participates in the behavioral responses mediated by prefrontal cortex during stress exposition. Beyond that we also show that BDNF antidepressant-like effect is dependent of mTOR. Therefore, our data suggest that it might exist an interaction between ketamine and BDNF antidepressant-like effects, since mTOR blockade is able to abolish the antidepressant-like effects of both agents.

*Correspondence to: Department of Physics and Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto (FCFRP), University of São Paulo(USP), Café Av, s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: +551636020248; fax: +551636024880.
E-mail address: vsp@usp.br

EBBS 2013 - your abstract no A-590-0008-00305 as Poster - New presentation date
1 mensagem

EBBS 2013 Abstract Team <hhebbbs2013@abstractserver.com> 28 de junho de 2013
09:07

Para: viktor.silvapereira@gmail.com

New Presentation Date

Dear Colleague,

We are happy to inform you, that your abstract

"BDNF-TrKB-mTOR pathway of the prelimbic cortex modulates the behavioral
responses to forced swim stress "

was accepted for Poster Session 3, on 9th September 2013 at 12:30 noon - poster
number P373.

All posters should be placed on the relevant poster board which is conveniently located
in the Dekanatsgang located behind the Registration counter on the
first floor.

- The size of your poster should not exceed 1.96 m (height) and 0.95 m (width).
 - Posters may be set-up on 7th September 2013 from 8:00am (earliest) to 11.00am.
(latest).
 - Posters should be removed between 15:00pm and 18:00pm (latest) on the day of the
poster session. - Posters not removed at this time will be discarded.
- Posters and other material cannot be sent to you after the conference.
Please note that the acceptance of your abstract is not containing the congress
registration and abstract acceptance is conditional on conference
registration and payment.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the EBBS-Team:
ebbs2013@interplan.de

We look forward to welcoming you in September in Munich!

With best regards,

Mathias V. Schmidt, PD, PhD
Chair, Local Organising Committee

ANEXO 2

Antidepressant-like effects induced by NMDA receptor blockade and NO synthesis inhibition in the ventral medial prefrontal cortex of rats exposed to the forced swim test

Vitor Silva Pereira · Angélica Romano ·
Gregers Wegener · Sâmia R. L. Joca

Received: 5 March 2014 / Accepted: 22 December 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Rationale Systemic treatment with NMDA receptor (NMDAR) antagonists, inhibitors of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) or of soluble guanylyl cyclase (sGC), induce antidepressant-like effects in rats. Increased levels of glutamate and nitric oxide (NO) in the medial prefrontal cortex (MPFC) of stressed animals have been described in the literature. However, the role of the NMDAR–nNOS–sGC pathway of the MPFC in the mediation of forced swim-induced behaviors remains unclear.

Objective The aim of this work was to test the hypothesis that the inhibition of the NMDAR–nNOS–sGC pathway in the ventral MPFC (infralimbic (IL) or prelimbic (PL)) would elicit antidepressant-like effects in the forced swim test (FST).

Methods Rats implanted with cannulae aimed at the PL or the IL were exposed to the FST and injected with LY235959 (NMDAR antagonist), NPA (nNOS inhibitor), ODQ (sGC inhibitor), or carboxy-PTIO (NO scavenger). Additional groups received the AMPA antagonist, NBQX, before the effective doses of LY235959 or NPA.

Results LY235959 administration into PL or IL before the FS pretest produced no effects. Administration of LY235959 (3 and 10 nmol/0.2 µL) after pretest was effective only when administered into the PL. However, the administration of NPA (0.01 nmol/0.2 µL), c-PTIO (1.0 nmol/0.2 µL), and ODQ (1.0 nmol/0.2 µL) into the PL or IL before the FST produced antidepressant-like effects. NBQX blocked the antidepressant-like effect of LY235959 but not of NPA.

Conclusion Blocking NMDAR or NO signaling in the vMPFC, either in the IL or the PL, induces antidepressant-like effects in the rat FST. These effects seemingly occur through independent mechanisms, since NBQX blocked the former effect but not the latter.

V. S. Pereira
Department of Pharmacology, School of Medicine, Campus
USP-Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

A. Romano · S. R. L. Joca (✉)
Department of Physics and Chemistry, School of Pharmaceutical
Sciences of Ribeirão Preto (FCFRP), University of São Paulo (USP),
Café Av, s/n, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil
e-mail: samia@usp.br

G. Wegener
Translational Neuropsychiatry Unit, Department of Clinical
Medicine, Aarhus University, 8240 Risskov, Denmark

G. Wegener
Centre of Excellence for Pharmaceutical Sciences, North West
University, Potchefstroom 2520, South Africa

S. R. L. Joca
Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences
(NAPNA), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Keywords Antidepressant · Glutamate · Nitric oxide ·
Prefrontal cortex · NMDA receptor · AMPA receptor · Stress

Introduction

Although depression was described many years ago, its neurobiology has not yet been fully comprehended (Nestler et al. 2002; Bale 2006). Stress has been thought to be the main environmental factor in precipitating depressive episodes (Manji et al. 2001; Wurtman 2005; Bale 2006; Price and Drevets 2009). Several studies have shown that exposure to stressful events can precipitate depressive episodes in humans

(Amat et al. 2005; Czeh et al. 2008; Calabrese et al. 2009; Hasler 2010).

Stress may promote plastic alterations in limbic regions, causing functional changes in brain areas important for emotional processing and coping, which ultimately could lead to affective disorders, such as depression (Rocher et al. 2004; Czeh et al. 2008; Hasler 2010).

The prefrontal cortex (PFC) is a limbic region intimately related with stress coping and depression neurobiology (Krishnan and Nestler 2008; Price and Drevets 2009). The PFC is divided into three regions, the medial prefrontal cortex (MPFC), the orbitofrontal cortex (OFC), and the lateral prefrontal cortex (LFC) (Ongur and Price 2000). More specifically, the medial prefrontal cortex in rats is divided in two parts: (1) the dorsal region, comprising the anterior cingulate (ACg) and the medial agranular (AGm); and (2) the ventral region, which is subdivided into prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices (Ongur and Price 2000; Vertes 2004). While the dorsal MPFC appears to be associated with motor behavior, the ventral MPFC (vMPFC), comprising the PL and IL, seems to be more related to cognition and emotional behavior (Heidbreder and Groenewegen 2003; Vertes 2006). Thus, MPFC has important high-order functions including memory formation, learning, and decision-making and furthermore, modulates autonomic, endocrine, and emotional responses to stress (Quirk et al. 2006; Resstel et al. 2006; Czeh et al. 2008; Maier and Watkins 2010). In addition, evidence suggests that the IL and the PL may be involved in the modulation of autonomic and behavioral responses to stress in different ways. For instance, PL stimulation enhances contextual fear conditioning of rats whereas the IL stimulation does the opposite (Vidal-Gonzalez et al. 2006). However, evidence from behavioral studies suggests that both IL and PL may be similarly involved in the modulation of innate fear (Lisboa et al. 2010) and learned fear (Resstel et al. 2006, 2008). Our research group has previously demonstrated that the blockade of synaptic transmission within the vMPFC induces antidepressant-like effect in the forced swim test (Scopinho et al. 2010), a well-known test for the screening of antidepressant drugs (reviewed by McArthur and Borsini 2006; Frazer and Morilak 2005). In the same work, we show that PL and IL could play similar or distinct roles depending on what time, during stress exposure, the pharmacological manipulation was performed (Scopinho et al. 2010).

Corroborating the involvement of the prefrontal cortex in the neurobiology of depression, clinical data have shown that depressed patients present elevated cortical activity which is correlated with elevated glutamate levels in that same area (Sanacora et al. 2004; Koenigs and Grafman 2009). Animal studies have also shown that stress exposure enhances glutamate levels in the prefrontal cortex (Moghaddam 1993; Zarate et al. 2003; Harvey et al. 2004). On the other hand, chronic administration of classical antidepressants knowingly

decreases the expression of NMDA receptors (NMDAR) in limbic areas, such as hippocampus and prefrontal cortex (Nowak et al. 1993; Skolnick et al. 1996; Pittaluga et al. 2007). Likewise, the treatment with NMDAR antagonists, e.g., ketamine, induces antidepressant effects in clinical and preclinical trials (Zarate et al. 2006; Li et al. 2010; Ibrahim et al. 2012). Therefore, this increased NMDA-mediated neurotransmission in the prefrontal cortex may be related to stress-induced behavioral consequences and to the neurobiology of depression. However, this hypothesis has not been tested by means of administering NMDAR antagonists into the MPFC. Additionally, the specific involvement of MPFC subregions in these effects and the downstream mechanisms are still unknown.

NMDAR is physically associated to neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the brain (Christopherson et al. 1999; Sattler et al. 1999). The activation of NMDAR by glutamate leads to calcium influx and nNOS activation with subsequent nitric oxide (NO) production (Garthwaite et al. 1989; Guix et al. 2005). NO is a highly diffusible and reactive molecule that can modulate neuronal function in an extended area by binding to several other molecules. The main target of NO is the enzyme soluble guanylyl cyclase (sGC), which, in response to NO binding, catalyzes the conversion of GTP in cGMP. While low concentrations of NO may exert physiological signaling properties, high levels of NO can be neurodegenerative (Guix et al. 2005; Shahani and Sawa 2011). Additionally, NO can modulate the levels of other neurotransmitters in the brain, including several monoamines (Guix et al. 2005) and glutamate itself (Shahani and Sawa 2011).

Interestingly, systemic administration of nitric oxide synthase inhibitors induces antidepressant-like effects in different preclinical models (Krass et al. 2010) and also improves mood in depressed patients (Naylor et al. 1987). Moreover, systemic administration of ODQ, a sGC inhibitor, in rodents induces similar antidepressant-like effects (Heiberg et al. 2002). More recently, Li and colleagues (Li et al. 2006) reported that cultured cells treated with conventional antidepressants presented an attenuated response to NMDAR- and NO-mediated signaling, therefore, suggesting that this could be part of antidepressant-induced effects. Corroborating these data, pretreatment with L-arginine, the precursor for NO synthesis, attenuates the antidepressant-like effect induced by conventional antidepressants (Krass et al. 2010) and also by ketamine (Zhang et al. 2013).

Altogether, these studies raise the hypothesis that the blockade of NMDAR may produce antidepressant-like effects by reducing NO formation into CNS. However, it is unclear whether the vMPFC participates in such effects. Furthermore, since the antidepressant-like effect of NMDAR antagonists has been shown to be dependent on the disinhibition of glutamate release and subsequently of the AMPA receptor activation (Machado-Vieira et al. 2012; Sanacora et al. 2012). Thus,

pre-treatment with an AMPA receptor antagonist would be expected to attenuate the antidepressant-like effects of nNOS inhibition provided that NO was the only downstream mechanism of NMDAR activation (Maeng et al. 2008; Autry et al. 2011; Koike et al. 2011).

Based on this hypothesis, the present study attempted to verify whether the administration of the NMDAR antagonist, the nNOS inhibitor, the NO scavenger, or the sGC inhibitor into the vMPFC would induce antidepressant-like effects in rats submitted to the forced swim test. Additionally, the particular involvement of PL and IL subregions of the vMPFC in these effects was also investigated.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 230–270 g at the beginning of each experiment were housed in pairs in a temperature-controlled room (24 ± 1 °C) under standard laboratory conditions with free access to food and water and a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 06:30 am). Procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which comply with international laws and policies. The protocols described herein were approved by the local Ethical Committee (CEUA 09.1.1617.53.2), and all efforts were made to minimize animal suffering.

Drugs

The following drugs were utilized: Selective NMDAR antagonist, LY235959 (Tocris, USA); nitric oxide synthase inhibitor, *N*^ω-propyl-L-arginine (NPA, Tocris, USA); extracellular nitric oxide scavenger, 2-(4-carboxyphenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-1H-imidazol-1-yloxy-3-oxid (c-PTIO, Tocris, USA); soluble guanylyl cyclase inhibitor, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ, Tocris, USA); AMPA receptor antagonist, 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX, Tocris, USA); Banamine (Schering-Plough, 0.25 %, 0.1 mL/100 g), lidocaine (PROBEM 3 %, 0.2 mL); 2,2,2-tribromoethanol (Sigma-Aldrich, 2.5 %, 1 mL/100 g). All drugs were dissolved in sterile saline, except for ODQ that was dissolved in DMSO 100 %.

Experimental procedures

Stereotaxic surgery and intracerebral drug administration

Seven days before the experiment, the animals were anesthetized with 2,2,2-tribromoethanol (2.5 %, 1 mL/100 g) and

fixed in a stereotaxic frame. After scalp anesthesia with 3 % lidocaine, the skull was surgically exposed, and stainless steel guide cannulae (26 G) were implanted bilaterally in the PL or IL using a stereotaxic apparatus (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Coordinates for cannula implantation into the PL (AP=+3.3 mm from bregma; L=+1.9 mm from the medial suture, V=−2.4 mm from the skull with a lateral inclination of 22°) and IL (AP=+3.3 mm from bregma; L=+2.7 mm from the medial suture, V=−3.2 mm from the skull with a lateral inclination of 24°) were selected from the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2007). The cannulae were attached to the skull bone with stainless steel screws and acrylic cement. After surgery, the animals received a poly-antibiotic (Pentabiotico®, Fort Dodge, Brazil) and a nonsteroidal anti-inflammatory (Banamine®, Schering Plough, Brazil) for post-operative analgesia. To perform the microinjections, the animals were gently covered with a soft towel during the time of infusion to avoid excessive movement and displacement of the injection needles.

Forced swim test (FST) The procedures for the FST were similar to those first described by Porsolt et al. (1977). Animals were initially placed individually in plastic cylinders (30 cm diameter by 70 cm height containing 30 cm of water at 25 ± 1 °C) (Joca and Guimaraes 2006) where they had to swim for 15 min (pre-test). Twenty-four hours later the animals were submitted to a 5-min session of forced swim (test). During this session, the total amount of time in which animals remained immobile was recorded by an observer who was blind to the treatments. The water was changed after each trial to avoid the influence of alarm substances (Abel and Bilitzke 1990).

Open field test

The open field test was carried out in a wooden quadratic arena (72×72×40 cm high, divided into 16 squares of 18×18 cm) located in a sound-attenuated, temperature-controlled (25 ± 1 °C) room, illuminated with three 40 W fluorescent bulbs placed 4 m above the apparatus. The number of total squares crossed was counted as a measure of mobility.

Histological analysis

After the behavioral tests, the animals were sacrificed under deep anesthesia with chloral hydrate solution 5 % (1 mL/100 g, intraperitoneally, C₂H₃Cl₃O₂, VETEC, Brazil) and perfused through the left ventricle of the heart with isotonic saline followed by 10 % formalin solution. Subsequently, Evan's blue dye was injected into the PL and IL as a marker. After a minimum period of 3 days immersed in a 10 % formalin solution, 40-μm brain sections were obtained in a Cryostat (Cryocut 1800). The injection sites were identified on diagrams from Paxinos and Watson's atlas (Paxinos and

Watson 2007). Animals receiving drugs outside the PL or the IL were joined together in an OUT group, which was used as a control group for the injection site.

Experimental design

Experiment 1: LY235959 microinjection into the PL of rats submitted to the forced swim test

Animals were randomly assigned to one of the three independent groups: The first group received bilateral microinjections into the PL of 0.2 μ L/side of either saline or LY235959 (1, 3, or 10 nmol), 5 min before the pre-test session; the second group received the same treatments into the PL immediately after the end of the pre-test; and the third group received the same treatments into the PL 5 min before the test session.

Experiment 2: LY235959 injection into the IL of rats submitted to the forced swim test

Similar to experiment 1, except that the animals received the microinjections into the IL instead of the PL.

Experiment 3: LY235959 injection into the PL or IL of rats submitted to the open field

Animals received a bilateral microinjection (0.2 μ L/side) of saline or LY235959 (3 and 10 nmol) into the PL or IL and were submitted to an open field 5 min later for motor behavior evaluation. In this experiment, only the effective doses of LY observed in experiment 1 were administered 5 min before the test session.

Experiment 4: NPA, c-PTIO, or ODQ microinjection into the PL of rats submitted to the forced swim test

Animals were randomly assigned to one of the two independent groups: The first group received bilateral microinjections into the PL of 0.2 μ L/side of either vehicle, NPA 0.01 nmol, c-PTIO 1 nmol (Aguiar et al. 2006; Alves et al. 2009; Tonetto et al. 2009), or ODQ 1 nmol (Aguiar et al. 2006; Tavares et al. 2007; Braga et al. 2009) into the PL immediately after the end of the pre-test; the second group received the same injections into the PL 5 min before the test session.

Experiment 5: NPA, c-PTIO or ODQ microinjection into the IL of rats submitted to the forced swim test

Animals were randomly assigned to receive bilateral microinjections into the IL (0.2 μ L/side) of either vehicle, NPA 0.01 nmol, c-PTIO 1 nmol, or ODQ 1 nmol, 5 min before the test session.

Experiment 6: effects of NPA, c-PTIO, or ODQ injection into the PL or IL of rats submitted to the open field

Animals received bilateral microinjection (0.2 μ L/side) of either vehicle, NPA 0.01 nmol, c-PTIO 1 nmol, or ODQ 1 nmol into the PL or IL and were submitted to an open field 5 min later for motor behavior evaluation. In this experiment, only the effective doses of the drugs injected at the second group of experiment 5 were administered.

Experiment 7: NBQX pretreatment effects on LY or NPA microinjection into the PL of rats submitted to the forced swim test

Animals received bilateral microinjection (0.2 μ L/side) of either vehicle or NBQX 4 nmol (Resstel and Correa 2006; Busnardo et al. 2012), and 5 min later, they received a second microinjection of either LY 10 nmol or NPA 0.01 nmol (Resstel et al. 2006; Tonetto et al. 2009; Aguiar and Guimaraes 2011), into the PL. Five minutes after the second injection, the animals were submitted to the test session of forced swim.

Statistical analysis

The results of the FST for each region (PL or IL) were analyzed using one-way ANOVA. Post hoc analysis was done using the Dunnett test. The results of the number of total square crossing in the OF during each minute for each region (PL or IL) were analyzed using a two-way ANOVA (factors: treatment and time). Probability < 0.05 was accepted as significant.

Results

Determination of microinjection sites

A representative diagram of coronal brain sections depicting bilateral microinjection sites in the PL or the IL of animals are shown in Fig. 1.

Effects of LY235959 microinjection into the PL of rats submitted to the forced swim test

The injection before the pre-test of LY 235959 did not induce any significant change (Fig. 2a). When injected after the pre-test, LY235959 effect was observed only at the dose of 3 nmol/0.2 μ L ($F_{(3,25)}=2.560$; $p=0.0777$; $p<0.05$) (Fig. 2b). LY235959 induced a decrease in the immobility time when injected into the PL at the two higher doses (3 and 10 nmol/0.2 μ L) 5 min before the test session ($F_{(3,24)}=13.12$; $p<0.05$)

Fig. 1 Representative coronal brain sections showing bilateral microinjection sites in the vmPFC-IL or vmPFC-PL. Closed circles represent the injection sites into vmPFC-IL or vmPFC-PL. Open circles

represent the injection sites out of the vmPFC-IL or PL (a). Representative photomicrographs of the injection sites into vmPFC-PL (b) and vmPFC-IL (c)

(Fig. 2c). The injections of LY outside the PL did not induce any significant change when compared with the control group.

Effects of LY235959 microinjection into the IL of rats submitted to the forced swim test

LY235959 injection before (Fig. 3a) or after (Fig. 3b) the pre-test did not induce any significant change in the immobility time. However, when injected 5 min before the test session, all three doses of LY235959 tested (1, 3, and 10 nmol/0.2 μ L) decreased the immobility time ($F_{(3,17)}=14.62$; $p<0.05$) (Fig. 3c). The injections of LY outside the IL did not induce any significant change when compared with the control group.

Effects of LY235959 injection into the PL or the IL of rats submitted to the open field

There was a significant effect of time ($F_{(4,90)}=8.506$; $p<0.001$), but no effect of treatment or interaction between treatment and time in the number of crossed squares at each minute when LY235959 was injected into the PL of the animals.

Similarly, no effect of treatment or interaction between treatment versus time was observed in the group receiving LY235959 into the IL, although a significant effect of time ($F_{(4,75)}=4.159$; $p<0.01$) was observed in the number of crossed squares at each minute.

Effects of NPA, c-PTIO, or ODQ microinjections into the PL of rats submitted to the forced swim test

NPA (0.01 nmol/0.2 μ L), c-PTIO (1.0 nmol/0.2 μ L) and ODQ (1.0 nmol/0.2 μ L) decreased the immobility time when injected into the PL after the pre-test ($F_{(3,23)}=15.39$; $p<0.05$) (Fig. 4a). Similar effects were observed when the drugs were administered 5 min before the test session ($F_{(3,32)}=13.10$; $p<0.05$) (Fig. 4b).

Effects of NPA, c-PTIO, or ODQ microinjections into the IL of rats submitted to the forced swim test

NPA (0.01 nmol/0.2 μ L), c-PTIO (1.0 nmol/0.2 μ L), and ODQ (1.0 nmol/0.2 μ L) decreased the immobility time when injected into the IL 5 min before the test session ($F_{(3,27)}=5.666$; $p<0.05$) (Fig. 4c).

Effects of NPA, c-PTIO, or ODQ injection into the PL or IL of rats submitted to the open field

NPA (0.01 nmol/0.2 μ L) and ODQ (1.0 nmol/0.2 μ L) administration into the PL did not induce any significant effect on the motor activity. Microinjection of c-PTIO (1.0 nmol/0.2 μ L) into the PL induced a significant reduction of the motor activity only during the first minute of the test. There was a significant effect of time ($F_{(4,85)}=8.794$; $p<0.05$) and treatment ($F_{(3,85)}=6.787$; $p<0.05$), but no interaction between

Fig. 2 Effects of the NMDAR antagonist (LY 235959) administration into vmPFC PL, over the immobility time of rats exposed to the FST. Effects of bilateral microinjections of vehicle, LY 1 nmol, LY 3 nmol, or LY 10 nmol into the vmPFC-PL, 5 min before the pre-test ($n=8$, $n=6$, $n=5$, $n=5$; respectively) (a); right after the pre-test ($n=8$, $n=8$, $n=7$, $n=6$; respectively) (b) and 5 min before the test ($n=9$, $n=5$, $n=7$, $n=7$; respectively) (c). Columns represent the mean and bars the SEM, * $p<0.05$ (compared with vehicle group), Dunnett's posttest

treatment versus time in the number of crossed squares at each minute (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc).

The microinjection of NPA (0.01 nmol/0.2 μ L), ODQ (1.0 nmol/0.2 μ L), or c-PTIO (1.0 nmol/0.2 μ L) into the IL did not induce any significant effect in the motor activity. There was a significant effect of time ($F_{(4,64)}=60.34$; $p<0.05$) and treatment ($F_{(3,64)}=4.550$; $p<0.05$) but no interaction between treatment versus time in the number of crossed

Fig. 3 Effects of the NMDAR antagonist (LY 235959) administration into vmPFC IL over the immobility time of rats exposed to the FST. Effects of bilateral microinjections of vehicle, LY 1 nmol, LY 3 nmol, or LY 10 nmol into the vmPFC-IL, 5 min before the pre-test ($n=6$, $n=9$, $n=6$, $n=7$; respectively) (a); right after the pre-test ($n=6$, $n=4$, $n=8$, $n=8$; respectively) (b) and 5 min before the test ($n=8$, $n=4$, $n=4$, $n=5$; respectively) (c). Columns represent the mean and bars the SEM, * $p<0.05$ (compared with vehicle group), Dunnett's posttest

squares at each minute (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc).

Effects of NBQX pretreatment on LY or NPA-induced effects

LY235959 (10 nmol/0.2 μ L) and NPA (0.01 nmol/0.2 μ L) reduced the immobility time in the FST ($F_{(5,38)}=17.34$; $p<0.05$; Dunnett) (Fig. 5). NBQX (4 nmol/0.2 μ L) pretreatment did not induce any significant effect per se, but it blocked

Fig. 4 Effects of the NO inhibitors (NPA, c-PTIO, and ODQ) administration into vmPFC PL or IL, over the immobility time of rats exposed to the FST. Effects of bilateral microinjections of vehicle, NPA 0.01 nmol, c-PTIO 1 nmol, or ODQ 1 nmol, into the vmPFC-PL, right after the pre-test ($n=8$, $n=6$, $n=8$, $n=5$; respectively) (**a**) and 5 min before the test ($n=15$, $n=7$, $n=5$, $n=9$; respectively) (**b**). Effects of bilateral microinjections of the same drugs into the vmPFC-IL 5 min. before the test ($n=7$, $n=8$, $n=9$, $n=7$; respectively) (**c**). Columns represent the mean and bars the SEM, * $p<0.05$ (compared with vehicle group), Dunnett's posttest

LY235959-induced effects (Fig. 5). However, NBQX pretreatment did not significantly change the behavioral effect induced by NPA treatment (Fig. 5).

Fig. 5 Effects of NBQX pretreatment on the effects of LY or NPA injection into the vmPFC-PL of rats submitted to the FST. Effects of bilateral microinjections of vehicle or NBQX 4 nmol, 5 min before the injection of vehicle, NPA 0.01 nmol, or LY 10 nmol, into the vmPFC-PL, injected 5 min before the test. saline+saline $n=10$, saline+LY $n=6$, saline+NPA $n=5$, NBQX+Saline $n=10$, NBQX+LY $n=5$ and NBQX+NPA $n=8$. Columns represent the mean and bars the SEM, * $p<0.05$ (compared with vehicle group), Dunnett's posttest

Discussion

The results of the present work show for the first time that the selective blockade of glutamate NMDAR within the vmPFC, either IL or PL, reduced the immobility time in rats submitted to the FST. Only minor differences regarding the effective dose of LY235959 and the moment of drug injection were observed when NMDA blockade was performed within PL or IL. Additionally, the study also showed that the inhibition of nNOS and sGC, as well as NO scavenging, induced similar effects in the FST. Altogether, these results suggest that the blockade of NMDA receptors and/or NO synthesis within the vmPFC induces antidepressant-like effects. However, since pre-treatment with NBQX, an AMPA antagonist, into the PL blocked LY235959-induced effects but did not affect NPA-induced effects; NMDAR activation and NO synthesis may induce their behavioral effects through independent mechanisms in the vmPFC during the modulation of FST stress.

To exclude the influence of false-positive results, the open field test was conducted as a control experiment in order to evaluate the possible influence of motor activity of rats treated with LY 235959, NPA, c-PTIO, and ODQ. Animals treated in the PL or IL with LY 235959 using doses which reduced the immobility time during the FST did not show significant alterations in the number of squares crossed in the open field test. Similarly, the administration of NPA and ODQ into the PL did not induce significant behavioral changes in the open field test. In contrast, c-PTIO administration into the PL reduced locomotor activity during the first minute of the open field test. However, similar effects have been previously described following systemic administration of both NOS inhibitors and imipramine (Heiberg et al. 2002; Harkin et al. 2003; Gigliucci et al. 2010). Since this reduction in the immobility period, the FST was seen after the same dose of c-PTIO, this

suggests that these unspecific locomotor changes are very unlikely to be due to the drug-induced behavioral changes observed in the FST.

Previous evidence from our research group substantiated that vMPFC subregions may play either similar or distinct roles at different times with respect to swim stress exposure (Scopinho et al. 2010). Similar results were observed in the present study with NMDAR blockade or NO inhibition within the PL or the IL, without major differences in the roles played by these two brain regions. Therefore, the present data provide new information about PL and IL involvement in the modulation of behavioral responses to swim stress, suggesting that NMDA-mediated glutamatergic neurotransmission would play a salient role immediately after swim stress exposure (within PL) and before the test (within PL and IL).

Efferent projections connect the PL and the IL to structures involved in the modulation of responses to stress. The PL is mainly connected to limbic regions known to affect cognition, such as the agranular insular cortex, anterior cingulate cortex, basolateral amygdala, paraventricular nucleus, and raphe nuclei of the midbrain whereas the IL is more closely associated to brain regions controlling visceral/autonomic activity during stress, such as the solitary nuclei of the brainstem, the bed nucleus of the stria terminalis, and the medial and central nuclei of the amygdala (Vertes 2004). These different anatomical connections may play a major role in the differences observed between PL and IL following NMDAR blockade immediately after stress exposure, given that PL is largely distributed in limbic brain regions affecting cognition, thus affecting fear learning and aversive memory consolidation. Within this context, NMDAR blockade in the PL may affect information processing related to the averseness of inescapable stress exposure, thereby changing how the animal interprets the stressful situation and allowing the development of coping responses. Corroborating this idea, increased processing of stressful memories has been described in depressed individuals and it is thought to lead to excessive arousal and fear reactions which in turn might impair adaptation to subsequent stress exposure and increase the vulnerability to the development of depression (Harmer et al. 2009; Kemp et al. 2009).

On the other hand, since the PL and IL are highly interconnected to each other (Vertes 2004), it is possible that they work as a complex that is able to integrate the different functions played by PL and IL in order to orchestrate a final common outcome in emotional and cognitive aspects of behavior. In this context, PL or IL manipulation would produce similar results, as observed when NMDAR blockade or nNOS inhibition was performed before the test. Therefore, these results suggest that NMDAR-mediated neurotransmission into the PL or the IL can modulate the processing of stress-induced behavioral outcomes.

These data are in line with the observation that systemic treatment with NMDAR antagonists induces antidepressant-like effects in preclinical models, including the FST (Trullas and Skolnick 1990; Li et al. 2010; Autry et al. 2011). Consequently and furthermore supported by the findings of the present work, it is plausible to suggest that the vMPFC could be an important brain region involved in this behavioral effect.

Since NMDAR agonism may lead to the activation of nNOS and NO synthesis in different neuronal populations in the brain, including the PFC (Rameau et al. 2003; Vincent 2010), the present work tested the hypothesis that NO release within the vMPFC would be a downstream mechanism following NMDAR activation. The results of the present study revealed that inhibiting NO synthesis, or its scavenging, in the PL or IL induced similar effects as the blockade of NMDAR. Considering that c-PTIO is an extracellular scavenger, it is likely that the NO released during FST may modulate neuronal function in neighboring cells, further promoting its behavioral effects. Since intra-PL or intra-IL administration of ODQ also induced similar antidepressant-like effects, increased cGMP in the PL or the IL may also be involved in NO-mediated behavioral effects during FST exposure. It is important to emphasize that, after the behavioral effects of NPA, c-PTIO, and ODQ were established, only NPA was utilized in the subsequent experiments since this drug blocks the initial step of NO signaling. Therefore, the present data suggest that the NMDAR–NO–cGMP pathway of the PL and IL cortices is an important signaling mechanism that may be involved in the neurobiology of stress-induced behavioral outcomes. This hypothesis is further documented by data showing decreased NO_x levels in the PFC of mice displaying reduced immobility time in the FST in response to systemic treatment with a drug modulating glutamatergic and nitrgic neurotransmission by blocking P2R receptors (Pereira et al. 2013). Moreover, chronic treatment with conventional antidepressant drugs is shown to attenuate NMDAR-mediated neurotransmission in the PFC (Popoli et al. 2012) and NO signaling (Dhir and Kulkarni 2011). Altogether, these data are in agreement with preclinical studies that reported an antidepressant-like effect in response to systemic treatment with nNOS or sGC inhibitors (Jefferys and Funder 1996; Yildiz et al. 2000; Joca and Guimaraes 2006; Zhou et al. 2007; Wegener and Volke 2010).

The antidepressant-like effect induced by NMDAR antagonists is shown to be dependent on glutamatergic AMPA receptors, since such behavioral effects can be blocked by pretreatment with AMPAR antagonist, like NBQX (Maeng et al. 2008; Koike et al. 2011). NBQX belongs to the quinoxaline dione derivatives, which represent the main class of drugs utilized for the study of AMPA receptors. It is also considered the prototype drug for AMPA receptor antagonists, since it has one of the best relations of selectivity obtained so far for AMPA competitive antagonists (1) (reviewed by Catarzi

et al. 2007). NMDAR blockade is suggested to induce a local disinhibition of glutamate release, which would in turn promote AMPAR activation (Machado-Vieira et al. 2012; Sanacora et al. 2012). Interestingly, studies have demonstrated that AMPAR agonists may also produce antidepressant effects (Alt et al. 2006; Nations et al. 2012). Based on these findings, we investigated whether NBQX could also abolish the behavioral effect induced by intra-PL administration of the NMDAR (LY235959) antagonist and the nNOS inhibitor (NPA). This approach would also help clarify whether NO signaling would be a downstream signaling mechanism to NMDAR activation in the PL.

The results obtained with NBQX injection before LY corroborates the data described in the literature which demonstrates that the antidepressant-like effects of NMDAR antagonists require AMPAR's normal functioning (Maeng et al. 2008; Autry et al. 2011; Koike et al. 2011). However, since the behavioral effect of the nNOS inhibitor was not neutralized by NBQX, the present work indicates that the behavioral effects elicited by NMDA antagonism and by nNOS inhibition may be mediated by independent mechanisms in the PL. This result is contradictory to the data described by Zhang et al. (2013) who reported that the antidepressant-like effects of NMDAR blockade involved a decrease in the activation of the L-arginine–nitric oxide pathway in the brain (Zhang et al. 2013). Their conclusion was, however, based on molecular changes investigated in the hippocampus, not in the MPFC.

The literature substantiates that activation of muscarinic M1 and M3 receptors may trigger NO production in cerebral frontal cortex preparations (Borda et al. 1998). Furthermore, there is evidence that the activation of P2X7 receptors by ATP may lead to NO production in the brain (Florenzano et al. 2008). It is interesting to note that systemic injection of muscarinic antagonists (Voleti et al. 2013), as well as P2XR antagonists (Pereira et al. 2013), induces antidepressant-like effects in the FST. However, the precise involvement of acetylcholine and ATP in the PL in the modulation of NO synthesis and stress-induced behavioral outcomes remains to be investigated.

In conclusion, we suggest that blocking NMDAR receptors or NO synthesis in the vMPFC (IL and PL) induces antidepressant-like effects, albeit through independent mechanisms. In addition, the results of the present work further support the involvement of the glutamatergic and nitrergic neurotransmission of the vMPFC in stress-induced behavioral outcomes.

Acknowledgments The authors are thankful to Flavia Salata for her helpful technical assistance. This work was supported by grants from FAPESP and CNPq.

Conflict of interest The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abel EL, Bilitzke PJ (1990) A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol Behav* 48:233–239
- Aguiar DC, Guimaraes FS (2011) Blockade of NMDA or NO in the dorsal premammillary nucleus attenuates defensive behaviors. *Physiol Behav* 103:279–283
- Aguiar DC, Moreira FA, Guimaraes FS (2006) Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacol Biochem Behav* 83:296–301
- Alt A, Nisenbaum ES, Bleakman D, Witkin JM (2006) A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochem Pharmacol* 71:1273–1288
- Alves FH, Crestani CC, Resstel LB, Correa FM (2009) Bed nucleus of the stria terminalis N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide modulate the baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. *J Neurosci Res* 87:1703–1711
- Amat J, Baratta MV, Paul E, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (2005) Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. *Nat Neurosci* 8:365–371
- Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, Kavalali ET, Monteggia LM (2011) NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*
- Bale TL (2006) Stress sensitivity and the development of affective disorders. *Horm Behav* 50:529–533
- Borda T, Genaro A, Sterin-Borda L, Cremaschi G (1998) Involvement of endogenous nitric oxide signalling system in brain muscarinic acetylcholine receptor activation. *J Neural Transm* 105:193–204
- Braga AA, Aguiar DC, Guimaraes FS (2009) NOC-9, a selective nitric oxide donor, induces flight reactions in the dorsolateral periaqueductal gray of rats by activating soluble guanylate cyclase. *Neurosci Lett* 459:79–83
- Busnardo C, Alves FH, Crestani CC, Scopinho AA, Resstel LB, Correa FM (2012) Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 23(11):1611–1622
- Calabrese F, Molteni R, Racagni G, Riva MA (2009) Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology* 34(Suppl 1):S208–S216
- Catarzi D, Colotta V, Varano F (2007) Competitive AMPA receptor antagonists. *Med Res Rev* 27(2):239–278
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467–27473
- Czeh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flugge G (2008) Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res* 190:1–13
- Dhir A, Kulkarni SK (2011) Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide* 24:125–131
- Florenzano F, Viscomi MT, Amadio S, D'Ambrosi N, Volonte C, Molinari M (2008) Do ATP and NO interact in the CNS? *Prog Neurobiol* 84:40–56
- Frazer A, Morilak DA (2005) What should animal models of depression model? *Neurosci Biobehav Rev* 29:515–523
- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S (1989) NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172:413–416
- Gigliucci V, Buckley KN, Nunan J, O'Shea K, Harkin A (2010) A role for serotonin in the antidepressant activity of NG-nitro-L-arginine, in the rat forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 94:524–533

- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76: 126–152
- Harkin A, Connor TJ, Walsh M, St John N, Kelly JP (2003) Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacology* 44:616–623
- Harner CJ, Goodwin GM, Cowen PJ (2009) Why do antidepressants take so long to work? A cognitive neuropsychological model of antidepressant drug action. *Br J Psychiatry* 195:102–108
- Harvey BH, Oosthuizen F, Brand L, Wegener G, Stein DJ (2004) Stress-restraint evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. *Psychopharmacology (Berlin)* 175:494–502
- Hasler G (2010) Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? *World Psychiatry* 9:155–161
- Heiberg IL, Wegener G, Rosenberg R (2002) Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. *Behav Brain Res* 134:479–484
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27:555–579
- Ibrahim L, Diazgranados N, Franco-Chaves J, Brutsche N, Henter ID, Kronstein P, Moaddel R, Wainer I, Luckenbaugh DA, Manji HK, Zarate CA Jr (2012) Course of improvement in depressive symptoms to a single intravenous infusion of ketamine vs add-on riluzole: results from a 4-week, double-blind, placebo-controlled study. *Neuropsychopharmacology* 37:1526–1533
- Jefferys D, Funder J (1996) Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur J Pharmacol* 295:131–135
- Joca SR, Guimaraes FS (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berlin)* 185:298–305
- Kemp AH, Hopkinson PJ, Hermens DF, Rowe DL, Sumich AL, Clark CR, Drinkenburg W, Abdi N, Penrose R, McFarlane A, Boyce P, Gordon E, Williams LM (2009) Fronto-temporal alterations within the first 200 ms during an attentional task distinguish major depression, non-clinical participants with depressed mood and healthy controls: a potential biomarker? *Hum Brain Mapp* 30:602–614
- Koenigs M, Grafman J (2009) The functional neuroanatomy of depression: distinct roles for ventromedial and dorsolateral prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 201:239–243
- Koike H, Iijima M, Chaki S (2011) Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. *Behav Brain Res* 224:107–111
- Krass M, Wegener G, Vasar E, Volke V (2010) The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. *Behav Brain Res*
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894–902
- Li YF, Zhang YZ, Liu YQ, Wang HL, Cao JB, Guan TT, Luo ZP (2006) Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function appears to be one of the common actions for antidepressants. *J Psychopharmacol* 20:629–635
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2010) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329:959–964
- Lisboa SF, Stecchini MF, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB (2010) Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience* 171:760–768
- Machado-Vieira R, Ibrahim L, Henter ID, Zarate CA Jr (2012) Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 100:678–687
- Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK (2008) Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry* 63: 349–352
- Maier SF, Watkins LR (2010) Role of the medial prefrontal cortex in coping and resilience. *Brain Res* 1355:52–60
- Manji HK, Drevets WC, Charney DS (2001) The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7:541–547
- McArthur R, Borsini F (2006) Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 436–452
- Moghaddam B (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60:1650–1657
- Nations KR, Dogterom P, Bursi R, Schipper J, Greenwald S, Zrakat D, Gertsik L, Johnstone J, Lee A, Pande Y, Ruigt G, Ereshefsky L (2012) Examination of Org 26576, an AMPA receptor positive allosteric modulator, in patients diagnosed with major depressive disorder: an exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Psychopharmacol*
- Naylor GJ, Smith AH, Connelly P (1987) A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. *Biol Psychiatry* 22:657–659
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13–25
- Nowak G, Trullas R, Laver RT, Skolnick P, Paul IA (1993) 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
- Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10:206–219
- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, London
- Pereira VS, Casarotto PC, Hiroaki-Sato VA, Sartim AG, Guimaraes FS, Joca SR (2013) Antidepressant- and anticomulsive-like effects of purinergic receptor blockade: involvement of nitric oxide. *Eur Neuropsychopharmacol*
- Pittaluga A, Raiteri L, Longordo F, Luccini E, Barbiero VS, Racagni G, Popoli M, Raiteri M (2007) Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus. *Neuropharmacology* 53:27–36
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G (2012) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* 13:22–37
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327–336
- Price JL, Drevets WC (2009) Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology*
- Quirk GJ, Garcia R, Gonzalez-Lima F (2006) Prefrontal mechanisms in extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry* 60:337–343
- Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB (2003) NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. *Neurobiol Aging* 24:1123–1133
- Resstel LB, Correa FM (2006) Injection of L-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor–nitric oxide in rat. *Neuropharmacology* 51:160–167
- Resstel LB, Joca SR, Guimaraes FG, Correa FM (2006) Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* 143:377–385
- Resstel LB, Souza RF, Guimaraes FS (2008) Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. *Physiol Behav* 93:200–205

- Rocher C, Spedding M, Munoz C, Jay TM (2004) Acute stress-induced changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cereb Cortex* 14:224–229
- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, Wu YT, Appel M, Rothman DL, Krystal JH, Mason GF (2004) Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry* 61:705–713
- Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62:63–77
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284:1845–1848
- Scopinho AA, Scopinho M, Lisboa SF, Correa FM, Guimaraes FS, Joca SR (2010) Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. *Behav Brain Res* 214:437–442
- Shahani N, Sawa A (2011) Nitric oxide signaling and nitrosative stress in neurons: role for *S*-nitrosylation. *Antioxid Redox Signal* 14:1493–1504
- Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R (1996) Adaptation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry* 29:23–26
- Tavares RF, Resstel LB, Correa FM (2007) Interaction between glutamatergic and nitrenergic mechanisms mediating cardiovascular responses to L-glutamate injection in the diagonal band of Broca in anesthetized rats. *Life Sci* 81:855–862
- Tonetto LL, Terzian AL, Del Bel EA, Guimaraes FS, Resstel LB (2009) Inhibition of the NMDA receptor/nitric oxide pathway in the dorsolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-like effects in rats submitted to the Vogel conflict test. *Behav Brain Funct* 5:40
- Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol* 185:1–10
- Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20
- Vidal-Gonzalez I, Vidal-Gonzalez B, Rauch SL, Quirk GJ (2006) Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. *Learn Mem* 13:728–733
- Vincent SR (2010) Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog Neurobiol* 90:246–255
- Voleti B, Navarria A, Liu RJ, Banasr M, Li N, Terwilliger R, Sanacora G, Eid T, Aghajanian G, Duman RS (2013) Scopolamine rapidly increases mammalian target of rapamycin complex 1 signaling, synaptogenesis, and antidepressant behavioral responses. *Biol Psychiatry*
- Wegener G, Volke V (2010) Nitric oxide synthase inhibitors as antidepressants. *Pharmaceuticals* 3:26
- Wurtman RJ (2005) Genes, stress, and depression. *Metabolism* 54:16–19
- Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N (2000) Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 149:41–44
- Zarate CA Jr, Du J, Quiroz J, Gray NA, Denicoff KD, Singh J, Charney DS, Manji HK (2003) Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. *Ann N Y Acad Sci* 1003:273–291
- Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK (2006) A randomized trial of an *N*-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63:856–864
- Zhang GF, Wang N, Shi JY, Xu SX, Li XM, Ji MH, Zuo ZY, Zhou ZQ, Yang JJ (2013) Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 110C:8–12
- Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY (2007) Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem* 103:1843–1854

ANEXO 3

Antidepressant- and anticomulsive-like effects of purinergic receptor blockade: Involvement of nitric oxide

Vitor S. Pereira^{a,1}, Plinio C. Casarotto^{a,1}, Vinícius A. Hiroaki-Sato^a, Ariandra G. Sartim^b, Francisco S. Guimarães^{a,c}, Sâmia R.L. Joca^{b,c,*}

^aDepartment of Pharmacology, School of Medicine, Campus USP, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

^bDepartment of Physics and Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Campus USP, Ribeirão Preto, SP 14040-904, Brazil

^cCenter for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of São Paulo, Brazil

Received 11 October 2012; received in revised form 27 December 2012; accepted 27 January 2013

KEYWORDS

P2 receptor;
PPADS;
Forced swimming
test;
Marble burying;
Purinergic system

Abstract

Activation of purinergic receptors by ATP (P2R) modulates glutamate release and the activation of post-synaptic P2R is speculated to induce nitric oxide (NO) synthesis. Increased glutamatergic and nitrergic signaling have been involved in the neurobiology of stress-related psychiatric disorders such as anxiety and depression. Therefore, the aim of this study was to test the effects of two P2R antagonists (PPADS and iso-PPADS) in animals submitted to models predictive of antidepressant-, anxiolytic- and anticomulsive-like effects. Swiss mice receiving PPADS at 12.5 mg/kg showed reduced immobility time in the forced swimming test (FST) similarly to the prototype antidepressant imipramine (30 mg/kg). This dose was also able to decrease the number of buried marbles in the marble-burying test (MBT), an anticomulsive-like effect. However, no effect was observed in animals submitted to the elevated plus maze (EPM) and to the open field test. The systemic administration of iso-PPADS, a preferential P2XR antagonist, also reduced the immobility time in FST, which was associated to a decrease in NO_x levels in the prefrontal cortex. In addition, P2X7 receptor was found co-immunoprecipitated with neuronal nitric oxide synthase (NOS1) in the prefrontal cortex. These results suggest that P2X7, possibly coupled to NOS1, could modulate behavioral responses associated to stress-related disorders and it could be a new target for the development of more effective treatments for affective disorders.

© 2013 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

*Correspondence to: Department of Physics and Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto (FCFRP), University of São Paulo (USP), Cafe Av, s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: +55 16 36024705; fax: +55 16 36024880.

E-mail address: samia@usp.br (S.R.L. Joca).

¹These authors contributed equally.

1. Introduction

Psychiatric disorders have serious impact over individual life quality and, given their high incidence, comprise important socioeconomic consequences (World Health Organization, 2008). Several of these disorders, such as major depression and generalized anxiety, have been extensively studied, but their pathophysiology is still incompletely understood (Graeff and Zangrossi, 2010; Harmer et al., 2009). This is also true for obsessive-compulsive disorder (OCD), an anxiety-spectrum disorder with a poorly understood neurobiology (Andersen et al., 2010). A common feature among these disorders, however, is that antidepressant drugs based on monoaminergic mechanisms have been in the front line of the treatment options (Graeff and Zangrossi, 2010; Hindmarch, 2002). These drugs, however, have serious limitations, such as being ineffective in approximately 40% of the patients and the need of several weeks of treatment before a therapeutic effect can be observed (Hindmarch, 2002). Therefore, new pharmacological, non-monoaminergic based, targets have been studied with the aim of developing more effective treatment options.

The interest in adenosine 5'-triphosphate (ATP) as a signaling molecule in the central nervous system (CNS) has increased in the last years due to studies showing its involvement in the modulation of several physiological and pathological processes in the brain (Burnstock, 2006, 2007; Burnstock et al., 2011a, b). For instance, in the CNS, ATP signaling is crucial for postnatal development, synaptic plasticity, cognitive and behavioral functions, neuropathic pain, neuroinflammation, neuroprotection and neurodegeneration (Burnstock et al., 2011a; Khakh and North, 2006). This signaling is mediated by the activation of P2 receptors (P2R), which can be distinguished in two major families: a P2X family of ligand-gated ion channels and a P2Y family of G-protein-coupled receptors (Abbracchio and Burnstock, 1994). There are eight subtypes of P2Y receptors (P2YR 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14), which are widely expressed in epithelial, immune and glial cells but they can also be found in neurons (Burnstock, 2008). P2YR activation increases intracellular inositol trisphosphate (IP3), thus triggering the release of calcium ions from intracellular stores into the cytosolic compartment (Butt, 2011). P2X receptors (P2XR) are ligand-gated nonspecific cation channels, which increase intracellular calcium by allowing its direct influx (James and Butt, 2002). P2XR are subdivided into seven subtypes (P2X1-7) and are highly expressed in the CNS (Burnstock, 2008). Therefore, in general, the activation of P2R by ATP triggers the increase of intracellular calcium concentrations, which is a determinant factor in modulating neurotransmitter release.

Activation of P2XR facilitates neurotransmitter release, particularly of glutamate, and stimulates single-channels opening (Florenzano et al., 2008; North, 2002). The increase in glutamate release in response to P2XR activation has been described for different brain structures and it involves a presynaptic mechanism (Cho et al., 2010; Inoue et al., 1992; Khakh, 2009; Khakh and Henderson, 1998). In addition, the activation of the P2XR may also modulate the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , thus facilitating/aggravating neuroinflammatory conditions (Bernardino et al., 2008; Miller et al., 2011; Wilson et al., 2007). P2R are widespread in the mammalian nervous system, including the brain, spinal cord, sensory systems and autonomic ganglia. In the CNS

they are found in regions involved in behavioral and emotional control, such as hippocampus, cerebral cortex, locus coeruleus and striatum, both in glial and neuronal cell types (Butt, 2011; Norenberg and Illes, 2000).

Increased glutamatergic neurotransmission have been implicated in several stress-related disorders, such as anxiety (Cortese and Phan, 2005; Simon and Gorman, 2006) and depression (Shors et al., 1989; Skolnick et al., 2009; Zarate et al., 2006). The increasing interest in this neurotransmission has been attributed to the fact that anti-glutamatergic drugs, such as riluzole, can be effective in depressive patients resistant to monoaminergic drugs (Zarate et al., 2010). Moreover, the glutamatergic NMDA receptor antagonist ketamine induces rapid and long-lasting antidepressant effects in clinical and preclinical models (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006). Significant anxiolytic-like effects have also been observed in response to ketamine and other anti-glutamatergic agents in animals and humans (Li et al., 2010; Machado-Vieira et al., 2012; Sanacora et al., 2012).

In addition to regulating glutamatergic neurotransmission, P2R might also modulate nitric oxide (NO) synthesis in the brain (Florenzano et al., 2008). Since the activation of NMDA receptors by glutamate leads to NO synthase (NOS) activation and NO synthesis (Garthwaite et al., 1989), Florenzano et al. (2008) proposed that purinergic mechanisms control nitric oxide (NO) levels by influencing NMDA receptors. However, there is also evidence that P2R and NOS1 are co-localized in hypothalamus, hippocampus and amygdaloid complex, therefore suggesting a direct involvement of the purinergic system in controlling NO synthesis in the brain (Kittner et al., 2003).

NO is thought to play an important role in the neurobiology of stress-related disorders (Jefferys and Funder, 1996; Joca and Guimaraes, 2006; Zhou et al., 2007). NOS inhibitors induce antidepressant- and anxiolytic-like effects in animal models such as the forced swimming (Bejjamini et al., 1998; Jefferys and Funder, 1996; Joca and Guimaraes, 2006; Wegener et al., 2010) and the elevated plus maze tests (Forestiero et al., 2006; Spiaci et al., 2008).

Therefore, it is plausible to suggest that the pharmacological blockade of P2R receptors could elicit antidepressant- and/or anxiolytic-like effects. In fact, Basso et al. (2009) reported that P2X7 receptor knockout (KO) mice presented an antidepressant-like phenotype, but no behavioral change in anxiety tests. On the other hand, another study described contradictory results (Boucher et al., 2011). Since results obtained with knockout animals may be confounded by the absence of the investigated receptor along brain development, it would be important to examine the effects induced by the pharmacological blockage of P2R. However, no such study has been performed so far. In addition, a possible involvement of NO in these effects has not been investigated yet.

Based on the aforementioned evidence, the objective of this study was to investigate the effects induced by the pharmacological blockade of P2R in animals submitted to models predictive of antidepressant- and anxiolytic-like effects. Considering that NOS inhibitors, as well as antidepressants that block serotonin reuptake, present anti-compulsive properties (Krass et al., 2010; Umathe et al., 2009), we also studied if P2R blockade would induce

anti-compulsive-like effects. Initially, we verified the effects of the non-selective P2R antagonist, PPADS, in animals exposed to forced swimming (FST), elevated plus maze (EPM) or marble burying (MBT) tests. The effects of a more selective P2XR antagonist, iso-PPADS, was also investigated in animals submitted to these tests. In addition, we determined whether the antidepressant-like effects induced by iso-PPADS treatment would be associated to changes in nitric oxide metabolites levels in the prefrontal cortex, striatum and hippocampus. Finally, we evaluated a possible interaction between P2R and NOS1 in these brain regions.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

The experiments were performed in male Swiss mice weighing 25–30 g. The animals were housed in groups of 10 mice/cage, under a 12 h light cycle (lights on at 7 am) and free access to food and water. Procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, which are in compliance with international laws and policies, and were approved by the local Ethical Committee (protocol number: 146/2009). All efforts were made to minimize the animal suffering. All experiments were performed using independent groups of experimentally naïve animals.

2.2. Drugs

The non-selective P2R antagonist pyridoxal-5'-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS, Tocris, USA), the selective P2XR antagonist pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',5'-disulfonic acid tetrasodium salt (iso-PPADS, Tocris, USA), the tricyclic antidepressant imipramine (IMI, Sigma-Aldrich, USA), the benzodiazepine agonist diazepam (DZP, Roche, Brazil) and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine (PRX, Pharmanostra, Brazil) were used. All drugs were suspended in sterile isotonic saline (vehicle), except diazepam that was suspended in Tween80 0.2% in sterile saline solution, and injected intraperitoneally (ip) in a 10 ml/kg volume.

2.3. Apparatus and procedure

2.3.1. Forced swimming test (FST)

Independent groups of mice were submitted to FST as described by [Porsolt et al. \(1977\)](#) with minor modifications. Animals were placed individually to swim in plastic cylinders (30 cm diameter by 40 cm height containing 10 cm of water at $25 \pm 1^\circ\text{C}$) for 6 min. During the last 4 min of the session the total amount of time the animals remained immobile (except for small limb movements necessary for floating) was recorded and later analyzed by a trained and treatment-blind experimenter. The water was changed after each trial to prevent any influence of alarm substances ([Abel and Bilitzke, 1990](#)).

2.3.2. Elevated plus maze test (EPM)

The anxiety-like behavior and locomotor activity were investigated using the EPM apparatus (wood-made, with two opposite open-arms, $30 \times 6 \text{ cm}^2$ and two enclosed arms, $30 \times 6 \times 15 \text{ cm}^3$, with a $6 \times 6 \text{ cm}^2$ central area and elevated 50 cm above the floor). The 5 min EPM sessions were recorded and a trained treatment-blind experimenter scored the percent of open arm entries (%OAE) and time spent (%OAT) and total enclosed-arms entries (EAE) ([Carobrez](#)

and [Bertoglio, 2005](#)). Rodents naturally avoid the open arms of the EPM and anxiolytic compounds typically increase the exploration of these arms without changing the number of enclosed-arm entries, which is an index of locomotor activity ([Carobrez and Bertoglio, 2005](#)).

2.3.3. Marble-burying test (MBT)

The test was performed using a squared box ($38 \times 32 \times 28 \text{ cm}^3$) with a 5 cm sawdust layer covered floor. Twenty-five green clear glass marbles (1.5 cm diameter) were evenly spaced over the floor. The mice were placed in the center of the marble-containing box and tested for 30 min. The criteria for counted buried marbles included only those with at least two-thirds under sawdust ([Njung'e and Handley, 1991](#)). The number of buried marbles was determined blindly to the group conditions.

2.3.4. Open field test (OFT)

The animals were placed in the center of a circular open field (OF) arena 40 cm in diameter 50 cm high Plexiglas wall where the exploratory activity was recorded during 6 min. Total distance traveled was determined using the ANY-MAZE software (Stoelting Co, Ranelagh, Dublin, Ireland).

2.3.5. Sample collection

Mice were deeply anaesthetized (chloral hydrate 0.75 g/kg), killed by decapitation and had their hippocampi, prefrontal cortex (4 mm slice from olfactory bulb) and striatum dissected. The tissue was homogenized in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8; 137 mM NaCl; glycerol 10% and supplemented with protease/phosphatase inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich P2714 and P0044), centrifuged at 10,000g for 15 min and stored at -80°C until use.

2.3.6. Nitrite/nitrate (NO_x) quantification

In order to convert nitrate (NO_3) into nitrite (NO_2), the supernatant was incubated overnight at 37°C with 0.4 U/ml nitrate reductase (#N7265, Sigma) and 1 mg/ml NADPH diluted in KH_2PO_4 0.2 M pH 7.5. The total NO_2 present in the samples was quantified using the Griess reagent kit for NO_2 determination (#G7921, Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The levels of NO_2 present in the samples were calculated based on the standard curve of NaNO_2 measured at 540 nm using VictorX3 spectrophotometer (Perkin Elmer).

The NO_2 level in each sample was normalized by the respective total protein content using the Bradford reagent (#B6916, Sigma) and expressed as NO_x ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) micromolar/micrograms of total protein.

2.3.7. Immunoprecipitation

Samples of prefrontal cortex, striatum and hippocampus from experimentally naïve animals were collected, processed as mentioned above and submitted to the immunoprecipitation method. Briefly, 500 μg of total protein content in each sample was incubated with 2 μg of anti-NOS1 antibody (Santa Cruz, USA, #sc5302) for 1 h at room temperature. Then, 20 μL of 0.25 mg/ml agarose beads solution (Protein G-Plus; Santa Cruz, USA, #sc2002) was added to each sample for 1 h at 4°C under agitation. Following the incubation, the samples were centrifuged at 1000g for 10 min at 4°C . The pellet was collected and washed with 40 μL of lysis buffer and centrifuged. This late step was repeated 3 times. Finally, the pellet was incubated with loading buffer (125 mM Tris-HCl; 4%SDS; 10% beta mercaptoethanol; 20% glycerol; 0.004% bromophenol blue), heated at 60°C for 15 min and centrifuged. The supernatant was submitted to western blotting procedure. Control samples of the immunoprecipitation method were incubated with Protein G-Plus without previous anti-NOS1 antibody and submitted to the same protocol.

2.3.8. Western blotting analysis

The protein content (30 µg) of samples collected in experiment 6 or those submitted to immunoprecipitation were separated in 12% SDS PAGE and transferred to PVDF membranes. Following blockade with 3% non-fat dry milk in TBST buffer (20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0.1% Tween20) the membranes containing the immunoprecipitated samples were incubated with primary anti P2X7 (1:500, Santa Cruz, USA, #sc25698), anti P2X1 (1:500, Santa Cruz, USA, #sc25692), anti P2Y1 (1:500, Santa Cruz, USA, #sc20123) or anti total NOS1 (1:500, Santa Cruz, USA, #sc5302) overnight at 4 °C under gentle agitation. Those containing samples from experiment 6 were exposed to anti-NOS1 phosphorylated at Ser1417 residue (p-NOS1; 1:1000, Abcam, UK, ab5583) or total NOS1 overnight at 4 °C under gentle agitation. The phosphorylated Ser1417 residue is found in the active NOS1 (Chiang et al., 2009; Donato et al., 2010; Garzon et al., 2011). The membranes were washed and incubated with the secondary HRP-conjugated antibody (1:2000, Santa Cruz, USA, #sc2317 or #sc2314). The chromogenic detection of HRP activity was performed using a commercial kit (Perkin Elmer, USA, #NEL300001EA). The membranes were scanned and analyzed using ImageJ 1.46 software (NIH, USA). The optical density relative to pNOS1 was normalized by total NOS1 and expressed as percent of control group.

2.4. Experimental procedure

2.4.1. Experiment 1: effect of PPADS in animals submitted to FST

Experimentally naïve mice received PPADS (6.25, 12.5, 25 or 50 mg/kg, $n=5-6$ /group), imipramine (15 mg/kg, $n=8$) or vehicle ($n=8$). FST was performed 30 min after the ip injections.

2.4.2. Experiment 2: effect of iso-PPADS in animals submitted to FST

Experimentally naïve received iso-PPADS (6.25, 12.5, 25 and 50 mg/kg, $n=5-7$ /group) or vehicle ($n=7$). They were submitted to FST 30 min after drug injection and anesthetized immediately after to tissue collection, as described above.

2.4.3. Experiment 3: effect of PPADS and iso-PPADS in animals submitted to MBT

Experimentally naïve mice were treated with PPADS (6.25 or 12.5 mg/kg, $n=8$ /group), paroxetine (5 mg/kg, $n=7$) or vehicle ($n=7$). MBT was performed 30 min after the ip injections. Independent groups of mice received iso-PPADS (6.25 or 12.5 mg/kg, $n=10-11$ /group), paroxetine (5 mg/kg, $n=5$) or vehicle ($n=11$) and were also submitted to MBT 30 min after drug injection.

2.4.4. Experiment 4: effect of PPADS and iso-PPADS in animals submitted to EPM

Experimentally naïve mice were treated with PPADS (12.5, 25 or 50 mg/kg, $n=5$ /group), iso-PPADS (6.25 or 12.5 mg/kg, $n=7$ /group), diazepam (2.5 mg/kg, $n=15$) or vehicle ($n=11$). They were tested in EPM 30 min after the ip injections.

2.4.5. Experiment 5: effect of PPADS and iso-PPADS in animals submitted to the open field

Experimentally naïve mice were treated with PPADS (12.5 mg/kg, $n=7$), iso-PPADS (12.5 mg/kg, $n=7$) or vehicle ($n=6$) and tested in the OFT 30 min after injections.

2.4.6. Experiment 6: NOS1 immunoprecipitation and P2R western blotting and effect of iso-PPADS in levels of active NOS1 Independent groups of experimentally naïve mice were treated with iso-PPADS (12.5 mg/kg, $n=5$) or vehicle ($n=6$) and submitted to FST 30 min after drug injection. Immediately after the test, animals were deeply anesthetized for sample collection as described above.

2.5. Statistical analysis

The data was analyzed by one-way ANOVA followed by the Dunnett's test for experiments 1-5 or Student's *t* test for experiment 6. The significance level was set at $p<0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1: effect of PPADS in animals submitted to FST

The effect of PPADS on the immobility time in FST can be seen in Figure 1. There was a significant treatment effect ($F(5.32)=11.85$, $p<0.05$). Imipramine and PPADS (12.5 mg/kg) induced a significant reduction in total immobility time compared to control group (Dunnett's: $p<0.05$ for both).

3.2. Experiment 2: effect of iso-PPADS in animals submitted to FST

As seen in Figure 2, iso-PPADS at 12.5 and 25 mg/kg decreased immobility time in FST compared to control group ($F(4.24)=3.07$, $p<0.05$, Dunnett's: $p<0.05$ for both). The effective dose of iso-PPADS (12.5 mg/kg) also decreased NO_x levels in the prefrontal cortex when compared with the control group ($F(2.17)=6.71$, $p<0.05$, Dunnett's: $p<0.05$). No treatment effect on NO_x levels was observed in the hippocampus ($F(2.17)=0.02$, non-significant (NS)) and striatum ($F(2.17)=0.1569$, NS).

3.3. Experiment 3: effect of PPADS and iso-PPADS in animals submitted to MBT

Paroxetine- and 12.5 mg/kg PPADS-treated groups showed a significant reduction in the number of buried marbles

Figure 1 Effect of PPADS systemic (ip) injections (6.25, 12.5, 25 or 50 mg/kg, $n=5-6$ /group), imipramine (IMI, 15 mg/kg, $n=8$) or vehicle ($n=8$) in mice submitted to forced swimming test (FST). Data expressed as Mean ± SEM of immobility time (s). * $p<0.05$ from control group.

compared to control group ($F(3.29)=13.67$; $p<0.05$, Dunnett's: $p<0.05$, Figure 3). None of the iso-PPADS doses tested were able to change the behavior of animals exposed to MBT, but paroxetine was able to decrease the number of buried marbles ($F(3.35)=8.38$; $p<0.05$).

3.4. Experiment 4 and 5: effect of PPADS and iso-PPADS in animals submitted to EPM and OF

No significant effect was observed in the exploration of EPM or OF (Table 1) with the doses of PPADS or iso-PPADS used. On the other hand, diazepam was able to increase the %OAT (treatment effect: $F(6.53)=5.65$, $p<0.05$) and %OAE (treatment effect: $F(6.53)=4.03$; $p<0.05$) in EPM.

Figure 2 (a) Effect of iso-PPADS ip injections (6.25, 12.5, 25 or 50 mg/kg, $n=5-7$ /group) or vehicle ($n=6$) in mice submitted to forced swimming test (FST). Data expressed as Mean $\pm$ SEM of immobility time (s), and (b) effect of iso-PPADS ip injections (6.25, 12.5 mg/kg, $n=6,7$) or vehicle ($n=6$) in the NO_x levels of animals submitted to FST. Data expressed as Mean $\pm$ SEM of NO_x micro-molar/micrograms of total proteins. * $p<0.05$ from control group.

3.5. Experiment 6: NOS1 immunoprecipitation and P2R western blotting and effect of iso-PPADS in levels of active NOS1

3.5.1. NOS1 immunoprecipitation and P2R western blotting

The data observed in Figure 4 indicates that all structures (prefrontal cortex, striatum and hippocampus) were positive for bands related to P2X7 (70 kDa, left panel) but not to P2X1 (70 kDa, right panel). Regarding the band relative to P2Y1 (45 kDa), we observed stronger positive labeling on samples from striatum and hippocampus while only a weak signal on prefrontal cortex was found (Figure 4, right panel). No labeling was observed in samples incubated with agarose beads only (data not shown). We also observed positive tag for NOS1 in pellet samples (data not shown).

Figure 3 (a) Effect of PPADS ip injections (6.25 or 12.5 mg/kg $n=8$ /group), paroxetine (prx, 5 mg/kg, $n=7$) or vehicle ($n=7$) in marble burying test (MBT), and (b) effects of iso-PPADS ip injections (6.25 or 12.5 mg/kg, $n=10-11$ /group), paroxetine (5 mg/kg, $n=5$) or vehicle ($n=11$) in MBT. Data expressed as Mean $\pm$ SEM of number of buried marbles. * $p<0.05$ from control group.

Table 1 Effect of PPADS, iso-PPADS, diazepam or vehicle in mice tested in the elevated plus maze (EPM) and open field (OF). Data expressed as Mean $\pm$ SEM of total distance traveled (m) in the OF, percent time in open arm (%OAT), percent entries in open arm (%OAE) or enclosed arm entries (EAE). * $p < 0.05$ from control group.

Drug	Dose (mg/Kg)	Distance traveled (m)	%OAT	%OAE	EAE
Vehicle	-	23.55 $\pm$ 2.24	28.76 $\pm$ 4.22	31.72 $\pm$ 3.09	11 $\pm$ 0.57
PPADS	12.5	28.39 $\pm$ 1.23	39.13 $\pm$ 6.16	36.22 $\pm$ 3.78	11.8 $\pm$ 1.53
	25	-	35.27 $\pm$ 5.99	41.82 $\pm$ 6.14	9.8 $\pm$ 1.02
	50	-	42.53 $\pm$ 4.01	40.95 $\pm$ 3.57	11.8 $\pm$ 0.37
iso-PPADS	6.25	-	23.6 $\pm$ 7.42	26.58 $\pm$ 4.48	10.71 $\pm$ 1.06
	12.5	22.28 $\pm$ 1.16	36.05 $\pm$ 5.37	35.63 $\pm$ 3.7	11.71 $\pm$ 0.97
Diazepam	2.5	-	57.08 $\pm$ 4.2*	50.22 $\pm$ 4.2*	13 $\pm$ 1.27

* $p < 0.05$ from vehicle group.

Figure 4 Positive labeling for P2X7 (70 kDa, left panel) and P2Y1 (45 kDa, right panel) but not P2X1 (70 kDa, right panel) on NOS1 immunoprecipitated samples from prefrontal cortex (ctx), striatum (str) and hippocampus (hpc) of mice.

3.5.2. Effect of iso-PPADS in levels of active NOS1

The Student's *t* test indicates a significant treatment effect in the immobility time in FST ($t(9)=2.56$; $p < 0.05$) and in the levels of pNOS1 in prefrontal cortex ($t(9)=2.48$; $p < 0.05$) but not in hippocampus ($t(9)=0.20$; NS). As seen in Figure 5 iso-PPADS antidepressant-like effect (Figure 5a) was associated with decreased levels of phosphorylated NOS1 in prefrontal cortex (Figure 5b) but not in hippocampus (Figure 5c) compared to control groups. No difference was observed in the levels of total NOS1 between groups in prefrontal cortex or hippocampus.

4. Discussion and conclusion

The present study showed that the blockade of the purinergic neurotransmission with PPADS, a non-selective P2R antagonist, and iso-PPADS, a P2XR antagonist, reduced the immobility time in FST, an antidepressant-like effect. We also found that PPADS, but not iso-PPADS, decreased the number of buried marbles in MBT, an anti-compulsive-like effect also observed with the administration of the positive control paroxetine. Moreover, PPADS and iso-PPADS did not induce significant effects in the exploration of the EPM.

Finally, no effect was observed in the open field test with any of the drugs tested, thus suggesting that the effects observed in FST and MBT would not be due to unspecific effects over the locomotor activity of the animals.

Although FST has questionable face validity, it has a very good predictive one, what makes it a very useful tool to identify new drugs with potential antidepressant effect (McArthur and Borsini, 2006; Morilak and Frazer, 2004; O'Neil and Moore, 2003). Classical and atypical antidepressant drugs (McArthur and Borsini, 2006; Li et al., 2010) reduce the immobility time of animals exposed to FST. Therefore, the effect observed with PPADS in FST suggests that blockade of P2R is able to induce antidepressant-like effects.

ATP was initially described as a cotransmitter in peripheral tissues, but evidence now shows that this molecule is released under physiological/pathological conditions in the central nervous system (for review see Burnstock et al., 2011b). The present results suggest that ATP could be released during stress exposure (possibly as a cotransmitter), and it would be able to modulate stress-induced behavioral responses through P2R activation. Corroborating this idea, a recent work has shown that ATP can be released by glial cells of the amygdaloid complex during fear memory consolidation (Stehberg et al., 2012).

The specific type of P2R mediating these behavioral effects is not yet known but it seems to involve P2XR, since iso-PPADS, which preferentially blocks these receptors, induced similar effects in FST. This assumption is further corroborated by reports that knockout animals for the receptor P2X7 showed reduced immobility time in FST (Basso et al., 2009; Florenzano et al., 2008).

Increased nitric oxide (NO) production is proposed to be one of the main mechanisms by which the purinergic transmission exerts its behavioral effects (Basso et al., 2009; Florenzano et al., 2008; Khakh, 2009; Kittner et al., 2003). Therefore, in order to investigate this possibility, we determined NO_x and p-NOS1 (active form of the enzyme) levels in brain regions of animals treated with iso-PPADS and exposed to FST. Our results showed that the antidepressant-like effect of iso-PPADS in FST was associated with a reduction in NO_x and p-NOS1 levels in the prefrontal cortex but not in hippocampus. The cause of this regional

Figure 5 (a) Effect of iso-PPADS (12.5 mg/kg) ip injections in FST and levels of phosphorylated NOS1 at Ser1417 residue in prefrontal cortex (b) and hippocampus (c). Data expressed as (a) Mean $\pm$ SEM of immobility time or (b,c) percent from vehicle-treated group. * $p < 0.05$ from control group.

difference is unknown. It could involve distinct expression of P2R subtypes between those brain regions. Also, ATP can induce dual effects on glutamate release, with both increase and decrease release being reported in cultured hippocampal neurons depending on the experimental conditions (Inoue et al., 1992; Inoue, 1998).

Besides the possibility of presynaptic control of glutamate release by P2R (Krugel et al., 2004), which would ultimately control NO levels, one has to consider that NO production may also occur independently of NMDA activation, especially in the prefrontal cortex (Sandoval et al., 2011). Thus, the effect of iso-PPADS reducing NO_x and p-NOS1 levels in prefrontal cortex samples could not be fully explained by a subsequent decrease in glutamate release.

Considering this scenario, the activation of postsynaptic P2XR leads to a calcium influx and directly activates NOS1 (Florenzano et al., 2008), as represented in Figure 6. As found in Figure 4, we observed positive labeling for P2X7 and P2Y1 in the pellet immunoprecipitated with NOS1. This result corroborates further evidence that these receptors can be co-localized with NOS1 in different brain regions (Kittner et al., 2003; Florenzano et al., 2008). Although the exact mechanisms of the interaction between P2R and NOS1 are presently unknown, we can speculate that proteins such as calmodulin kinases and protein kinase C, which are stimulated following P2R activation (Díaz-Hernández et al., 2008; Ohnishi et al., 2009), could act as scaffolding complex between P2R and NOS1.

A large body of evidence has shown that exposure to stress increases NO levels in different limbic regions (Ishizuka et al., 2000; Moghaddam, 1993; Zlatkovic and Filipovic, 2012). In addition, supporting a possible involvement of increased NO levels in the neurobiology of depression, inhibition of NO synthesis induces antidepressant-like effects in different pre-clinical models (Wegener et al., 2010; Montezuma et al., 2012). Therefore, our data suggest that P2R may also represent an important target that is able to control NO synthesis in prefrontal cortex and induce antidepressant-like effects. Interestingly, similar to NOS inhibitors, PPADS and iso-PPADS produced 'U-shaped' dose-response curves in FST, reinforcing the idea of a possible interaction between these neurotransmitter systems (Montezuma et al., 2012; Wegener et al., 2010).

The involvement of the prefrontal cortex in depression has been the focus of intense research in the last decade (Czeh

Figure 6 Graphical representation of possible interactions between purinergic, glutamatergic and nitrergic systems modulating behavioral consequences of stress. Black arrows represent the pathway (direct activation of NOS1 by P2XR) proposed to explain the present results: P2R activation following ATP release as cotransmitter during stressful events leads to neuronal nitric oxide synthase (NOS1) activation and nitric oxide (NO) production. The gray arrow indicates a possible alternative pathway involving glutamate release.

et al., 2008; Price and Drevets, 2010). Our data is consistent with its possible involvement in the antidepressant-like effect induced by P2R blockade, since reduced levels of NO_x and p-NOS1 were found in the prefrontal cortex of mice treated with iso-PPADS. In addition, the antidepressant-like effect elicited by conventional antidepressant drugs or by NOS1 inhibitor involves modulation of medial prefrontal cortex activity during stress (Silva et al., 2012). Taken together, these results suggest that the antidepressant-like effect induced by iso-PPADS is mediated by a reduction in NO levels in the prefrontal cortex during stress.

There are contradictory results regarding the involvement of ATP in anxiety (Kittner et al., 2003). Increased or

unchanged exploration of the EPM has been described for P2X7 knockout mice (Basso et al., 2009; Boucher et al., 2011). In rats, the blockade of P2R with PPADS induced anxiogenic-like effects in the EPM (Kittner et al., 2003) whereas in our study PPADS and iso-PPADS failed to modify exploration of this apparatus. Differences in the species, drug administration route (i.c.v microinjection versus systemic) and doses used between studies may have contributed for the discrepant results. Further experiments using other animal models and selective antagonists for the different P2R could help to clarify this issue.

MBT was initially proposed as a model predictive of anxiolytic-like drug effects (Njung'e and Handley, 1991). However, recent studies suggest that this test is a predictive model of repetitive behaviors related to obsessive-compulsive disorders (OCD) (Thomas et al., 2009). Several pieces of evidence indicate the involvement of glutamate/NO neurotransmission in OCD (Aboujaoude et al., 2009; Egashira et al., 2008; Grant et al., 2007). Anti-glutamatergic drugs (Iijima et al., 2010) or NO synthase inhibitors (Krass et al., 2010; Umathe et al., 2009) reduce the number of buried marbles in this test, an anticomulsive-like effect. Since the purinergic and glutamatergic systems interact (Cho et al., 2010; Inoue et al., 1992; Khakh, 2009; Khakh and Henderson, 1998), we investigated whether the blockade of purinergic transmission would decrease repetitive behavior in MBT by impairing glutamatergic/nitric transmission. PPADS, but not iso-PPADS, attenuated the repetitive behavior measured in MBT. These results suggest that blockade of P2R could promote anti-compulsive-like effect and that these effects are likely to be mediated by P2YR, since iso-PPADS failed to induce significant effects in MBT. This is the first evidence that the purinergic system is involved in the control of repetitive/compulsive behaviors and it further corroborates the proposal that the EPM and MBT evaluate different behavioral dimensions of anxiety (Thomas et al., 2009). The molecular mechanisms downstream to the P2YR responsible for such effects are not yet clear and warrant further investigation.

In conclusion, the present results suggest that purinergic blockade can produce antidepressant- and anticomulsive-like effects. The antidepressant-like effect seems to occur through a P2XR dependent mechanism, possibly coupled to NOS1, and involving a decrease in NO synthesis in the prefrontal cortex. The anticomulsive-like effect, on the other hand, would be mediated by blockade of P2YR. Therefore, P2R could be an interesting alternative for targeting glutamatergic and nitric neurotransmission in order to induce antidepressant and/or anticomulsive effects as a promising therapeutic option.

Role of funding source

Funding for this study was provided by FAPESP (2011/17281-7 and 2007/03685-3) and CNPq (471732/2010-9 and 471382/2011-6); both agencies had no further role in study design; data collection, analysis and interpretation; in the writing of the manuscript and in the decision to submit the paper for publication in this journal.

Contributors

Authors VSP and PCC performed the forced swimming test experiments. VSP wrote the manuscript draft and PCC performed the

immunoprecipitation and western blotting analysis. VHS and AGS performed the elevated plus maze test and determination of NO_x levels. FSG and SLJ designed the experiments and contributed to manuscript edition. All authors contributed and approved the manuscript as presented.

Conflict of interest

All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank Flavia F. Salata and José C. Aguiar for helpful technical assistance.

References

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., 1994. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445-475.
- Abel, E.L., Bilitzke, P.J., 1990. A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol. Behav.* 48, 233-239.
- Aboujaoude, E., Barry, J.J., Gamel, N., 2009. Memantine augmentation in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: an open-label trial. *J. Clin. Psychopharmacol.* 29, 51-55.
- Andersen, S.L., Greene-Colozzi, E.A., Sonntag, K.C., 2010. A novel, multiple symptom model of obsessive-compulsive-like behaviors in animals. *Biol. Psychiatry* 68, 741-747.
- Basso, A.M., Bratcher, N.A., Harris, R.R., et al., 2009. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. *Behav. Brain Res.* 198, 83-90.
- Beijamini, V., Skalisz, L.L., Joca, S.R., et al., 1998. The effect of oxcabazepine on behavioural despair and learned helplessness. *Eur. J. Pharmacol.* 347, 23-27.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., et al., 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry* 47, 351-354.
- Bernardino, L., Balosso, S., Ravizza, T., et al., 2008. Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1 β release. *J. Neurochem.* 106, 271-280.
- Boucher, A.A., Arnold, J.C., Hunt, G.E., et al., 2011. Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. *Neuroscience* 189, 170-177.
- Burnstock, G., 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol. Rev.* 58, 58-86.
- Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659-797.
- Burnstock, G., 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 575-590.
- Burnstock, G., Fredholm, B.B., Verkhratsky, A., 2011a. Adenosine and ATP receptors in the brain. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 973-1011.
- Burnstock, G., Krügel, U., Abbracchio, M.P., et al., 2011b. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* 95, 229-274.
- Butt, A.M., 2011. ATP: a ubiquitous gliotransmitter integrating neuron-glial networks. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 205-213.
- Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1193-1205.
- Chiang, H.T., Cheng, W.H., Lu, P.J., et al., 2009. Neuronal nitric oxide synthase activation is involved in insulin-mediated

- cardiovascular effects in the nucleus tractus solitarii of rats. *Neuroscience* 159, 727-734.
- Cho, J.H., Choi, I.S., Jang, I.S., 2010. P2X7 receptors enhance glutamate release in hippocampal hilar neurons. *Neuroreport* 21, 865-870.
- Cortese, B.M., Phan, K.L., 2005. The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS Spectr.* 10, 820-830.
- Czeh, B., Perez-Cruz, C., Fuchs, E., et al., 2008. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav. Brain Res.* 190, 1-13.
- Díaz-Hernandez, M., del Puerto, A., Díaz-Hernandez, I., et al., 2008. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 121, 3717-3728.
- Donato Jr., J., Frazao, R., Fukuda, M., et al., 2010. Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. *Endocrinology* 151, 5415-5427.
- Egashira, N., Okuno, R., Harada, S., et al., 2008. Effects of glutamate-related drugs on marble-burying behavior in mice: implications for obsessive-compulsive disorder. *Eur. J. Pharmacol.* 586, 164-170.
- Florenzano, F., Viscomi, M.T., Amadio, S., et al., 2008. Do ATP and NO interact in the CNS? *Prog. Neurobiol.* 84, 40-56.
- Forestiero, D., Manfrim, C.M., Guimaraes, F.S., et al., 2006. Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. *Psychopharmacology* 184, 166-172.
- Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M., et al., 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 172, 413-416.
- Garzon, J., Rodriguez-Munoz, M., Vicente-Sanchez, A., et al., 2011. RGS22 binds to the neural nitric oxide synthase PDZ domain to regulate mu-opioid receptor-mediated potentiation of the N-methyl-D-aspartate receptor-calmodulin-dependent protein kinase II pathway. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 873-887.
- Graeff, F.G., Zangrossi Jr., H., 2010. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 10, 207-217.
- Grant, P., Lougee, L., Hirschtritt, M., et al., 2007. An open-label trial of riluzole, a glutamate antagonist, in children with treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 17, 761-767.
- Harmer, C.J., Goodwin, G.M., Cowen, P.J., 2009. Why do antidepressants take so long to work? A cognitive neuropsychological model of antidepressant drug action. *Br. J. Psychiatry* 195, 102-108.
- Hindmarch, I., 2002. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *Eur. Psychiatry* 17 (Suppl. 3), S294-S299.
- Iijima, M., Kurosu, S., Chaki, S., 2010. Effects of agents targeting glutamatergic systems on marble-burying behavior. *Neurosci. Lett.* 471, 63-65.
- Inoue, K., Nakazawa, K., Fujimori, K., et al., 1992. Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked glutamate release in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 134, 215-218.
- Inoue, K., 1998. The functions of ATP receptors in hippocampus. *Pharm. Res.* 38, 323-331.
- Ishizuka, Y., Ishida, Y., Jin, Q., et al., 2000. Differential profiles of nitric oxide and norepinephrine releases in the paraventricular nucleus region in response to mild footshock in rats. *Brain Res.* 862, 17-25.
- James, G., Butt, A.M., 2002. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca^{2+} signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 247-260.
- Jefferys, D., Funder, J., 1996. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 295, 131-135.
- Joca, S.R., Guimaraes, F.S., 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology* 185, 298-305.
- Khakh, B.S., 2009. ATP-gated P2X receptors on excitatory nerve terminals onto interneurons initiate a form of asynchronous glutamate release. *Neuropharmacology* 56, 216-222.
- Khakh, B.S., Henderson, G., 1998. ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol. Pharmacol.* 54, 372-378.
- Khakh, B.S., North, R.A., 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-532.
- Kittner, H., Franke, H., Fischer, W., et al., 2003. Stimulation of P2Y1 receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: implications for the involvement of P2Y1 receptor-mediated nitric oxide production. *Neuropsychopharmacology* 28, 435-444.
- Krass, M., Runkorg, K., Wegener, G., et al., 2010. Nitric oxide is involved in the regulation of marble-burying behavior. *Neurosci. Lett.* 480, 55-58.
- Krugel, U., Schraft, T., Regenthal, R., et al., 2004. Purinergic modulation of extracellular glutamate levels in the nucleus accumbens in vivo. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 565-570.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.J., et al., 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959-964.
- Machado-Vieira, R., Ibrahim, L., Henter, I.D., et al., 2012. Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 678-687.
- McArthur, R., Borsini, F., 2006. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84, 436-452.
- Miller, C.M., Boulter, N.R., Fuller, S.J., et al., 2011. The role of the P2X(7) receptor in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 7, e1002212.
- Moghaddam, B., 1993. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J. Neurochem.* 60, 1650-1657.
- Montezuma, K., Biojone, C., Lisboa, S.F., Cunha, F.Q., Guimarães, F.S., Joca, S.R., 2012. Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacology* 62(1), 485-491.
- Morilak, D.A., Frazer, A., 2004. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7, 193-218.
- Njung'e, K., Handley, S.L., 1991. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 63-67.
- Norenberg, W., Illes, P., 2000. Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 324-339.
- North, R.A., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013-1067.
- Ohnishi, T., Matsumura, S., Ito, S., 2009. Translocation of neuronal nitric oxide synthase to the plasma membrane by ATP is mediated by P2X and P2Y receptors. *Mol. Pain* 5, 40-56.
- O'Neil, M.F., Moore, N.A., 2003. Animal models of depression: are there any? *Hum. Psychopharmacology* 18, 239-254.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229, 327-336.
- Price, J.L., Drevets, W.C., 2010. Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 35, 192-216.
- Sanacora, G., Treccani, G., Popoli, M., 2012. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62, 63-77.
- Sandoval, R., González, A., Caviedes, A., et al., 2011. Homeostatic NMDA receptor down-regulation via brain derived neurotrophic

- factor and nitric oxide-dependent signalling in cortical but not in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 118, 760-772.
- Shors, T.J., Seib, T.B., Levine, S., et al., 1989. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science* 244, 224-226.
- Silva, M., Aguiar, D.C., Diniz, C.R., et al., 2012. Neuronal NOS inhibitor and conventional antidepressant drugs attenuate stress-induced fos expression in overlapping brain regions. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32, 443-453.
- Simon, A.B., Gorman, J.M., 2006. Advances in the treatment of anxiety: targeting glutamate. *NeuroRx* 3, 57-68.
- Skolnick, P., Popik, P., Trullas, R., 2009. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 563-569.
- Spiacci Jr., A., Kanamaru, F., Guimaraes, F.S., et al., 2008. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 247-255.
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R., Salazar, C., Becerra, A., Echeverría, C., Orellana, J.A., Bultynck, G., Ponsaerts, R., Leybaert, L., Simon, F., Sáez, J.C., Retamal, M.A., 2012. Release of gliotransmitters through astroglial connexin 43 hemichannels is necessary for fear memory consolidation in the basolateral amygdala. *FASEB J.* 26(9), 3649-3657.
- Thomas, A., Burant, A., Bui, N., et al., 2009. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology* 204, 361-373.
- Umathe, S.N., Bhutada, P.S., Jain, N.S., et al., 2009. Role of nitric oxide in obsessive-compulsive behavior and its involvement in the anti-compulsive effect of paroxetine in mice. *Nitric Oxide* 21, 140-147.
- Wegener, G., Harvey, B.H., Bonefeld, B., et al., 2010. Increased stress-evoked nitric oxide signalling in the Flinders sensitive line (FSL) rat: a genetic animal model of depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13, 461-473.
- Wilson, H.L., Varcoe, R.W., Stokes, L., et al., 2007. P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 151, 115-127.
- World Health Organization, 2008. The global burden of disease: 2004 update. World Health Organization, Geneva.
- Zarate Jr., C., Machado-Vieira, R., Henter, I., et al., 2010. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? *Harv. Rev. Psychiatry* 18, 293-303.
- Zarate Jr., C.A., Singh, J.B., Carlson, P.J., et al., 2006. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 856-864.
- Zhou, Q.G., Hu, Y., Hua, Y., et al., 2007. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J. Neurochem.* 103, 1843-1854.
- Zlatkovic, J., Filipovic, D., 2012. Bax and B-cell-lymphoma 2 mediate proapoptotic signaling following chronic isolation stress in rat brain. *Neuroscience* 223, 238-245.