UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação do DNA

Karina Montezuma

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação do DNA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Karina Montezuma

Orientadora: Profa. Dra. Sâmia R. L. Joca

Ribeirão Preto
2016

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.

Montezuma, Karina
Efeito de antiagonistas do receptor NMDA sobre a metilação do DNA. Ribeirão Preto, 2016.
164 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Joca, Sâmia Regiane Lourenço.

1. NMDA. 2. Metilação do DNA. 3. Nado Forçado

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karina Montezuma
Efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação do DNA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa Dra. Sâmia R. L. Joca

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Aos meus pais, Marcelo e Luci,

Com todo amor, admiração e gratidão que lhes tenho,

Pelo apoio incondicional, incentivo e compreensão,

Dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Sâmia Joca, pela orientação, paciência e todas as oportunidades concebidas desde os tempos de iniciação científica. Pelos ensinamentos e preocupação com a minha formação e amadurecimento científico. À “chefa” e amiga Sâmia, por toda a confiança, apoio e momentos compartilhados em todos esses anos.

À Caroline Biojone, minha co-orientadora da iniciação científica ao mestrado, a pessoa que mesmo estando longe (bem longe!) se manteve tão presente. Obrigada por nunca ter medido esforços para me ajudar e responder aos meus questionamentos e dúvidas “cruéis”, pela amizade, ensinamentos valiosos e o incentivo a continuar na área científica, contribuindo para que eu notasse o apreço que tenho às indagações constantes à esta.

À Sabrina Lisboa e ao Plínio Cassaroto, que contribuiram muito à minha formação e amadurecimento científico também. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com vocês, por todo o aprendizado e amizade.

Ao professor Dr. Francisco S. Guimarães e ao Pofessor Dr. Leonardo Resstel, pelas discussões, “empréstimos” de materiais e espaço cedido em seus respectivos laboratórios sempre que precisei.

À minha primeira “aluna” de iniciação científica, Thais de Lucca, por toda a ajuda, confiança, dedicação e questões que me fez. Você me incentivou a aprender mais a cada dia.

Aos amigos do laboratório pela parceria, ajuda mútua, excelente convívio e longas discussões acadêmicas ou “assuntos aleatórios”. Por terem contribuído para o meu crescimento pessoal e profissional.

À técnica do laboratório, Flávia Sallata, por toda a disponibilidade e auxílio, essencial para a condução deste trabalho.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2014/02666-9) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 131816/2014-4).

Ao meu namorado, Eduardo A. Ribeiro, por sempre me incentivar.

Aos meus irmãos, Fábio Montezuma e Thais Montezuma, pela preocupação e por sempre estarem ao meu lado. Em especial à Thais e também ao meu cunhado, Sebastián A. V. Carranza, por permitirem que eu ficasse por muitos dias na casa deles na fase final do mestrado.

Por fim, aos meus pais, Marcelo C. Montezuma e Luci F. Montezuma, meus exemplos, por nunca terem medido esforços pela minha felicidade, por todo o amor, dedicação, ensinamentos e incentivo, por sempre acreditarem em mim. Não há palavras para agradecê-los.

“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo,
quem busca e vence obstáculos,
no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar

RESUMO

MONTEZUMA, K. **Efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação do DNA**. 2016. 164f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A depressão é uma doença com alta incidência na população mundial e os antidepressivos atualmente disponíveis não são completamente eficazes. Esses fármacos apresentam uma latência de 2-4 semanas para induzir uma melhora significativa dos sintomas e cerca de 45% dos pacientes não respondem ao tratamento, cujo mecanismo é baseado na facilitação da neurotransmissão monoaminérgica no SNC. Por outro lado, recentemente tem sido demonstrado que a ketamina, antagonista do receptor de glutamato do tipo NMDA induz um efeito antidepressivo rápido e sustentado em animais e pacientes. No entanto, o uso dessa droga para o tratamento da depressão possui diversas limitações e, assim, o entendimento dos mecanismos subjacentes à sua ação antidepressiva pode contribuir para o desenvolvimento de novas e melhores alternativas terapêuticas. Estes mecanismos parecem ser mais complicados do que simplesmente o bloqueio do receptor NMDA, dado que tal bloqueio com o antagonista MK-801, por exemplo, induz efeito tipo-antidepressivo no teste do nado forçado (FST) por até 3 horas, mas sem reproduzir os efeitos prolongados da ketamina. Por isso, a cascata de eventos neuroquímicos iniciada após a administração de ketamina que culmina com a regulação da expressão gênica e síntese de proteínas relacionadas aos processos de plasticidade neural têm sido alvo de grande investigação a fim de se compreender o mecanismo de ação subjacente ao efeito antidepressivo rápido e sustentado dessa droga. A expressão desses genes pode ser modulada por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, um processo realizado por DNA metiltransferases (DNMTs), que também tem apresentado grande relevância para a neurobiologia da depressão. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de antagonistas do receptor NMDA, ketamina e MK-801, em doses e protocolos de tratamento que promovam efeito tipo-antidepressivo no FST, sobre a metilação do DNA em estruturas encefálicas importantes para a neurobiologia da depressão, em animais submetidos ou não ao estresse de nado forçado. Para tanto, primeiramente, foram delineados protocolos experimentais para análise do efeito tipo-antidepressivo destas drogas: Em ratos, administração sistêmica aguda de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg 23 horas após a sessão pré-teste e 1 hora ou 7 dias antes da sessão teste do FST, permitiu a análise de um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado induzido pela ketamina e apenas rápido pelo MK-801. Em seguida, utilizando estes protocolos, avaliou-se os efeitos do estresse do pré-teste do FST e do tratamento com tais antagonistas do receptor NMDA sobre os níveis de metilação global do DNA e expressão de DNMT3a e DNMT3b no córtex frontal, hipocampo ventral e dorsal dos animais. Foram encontradas alterações nas quantificações realizadas, sugerindo que o estresse e o tratamento podem induzir efeitos importantes sobre a metilação do DNA nas estruturas analisadas. Além disso, o tratamento com ketamina ou MK-801 parecem induzir efeitos diferenciais em algumas regiões, o que poderia estar associado aos efeitos também distintos que apresentam sobre a ação antidepressiva.

Palavras-chave: Antidepressivo, NMDA, ketamina, MK-801, metilação do DNA, FST.

ABSTRACT

MONTEZUMA, K. **Effect of NMDA receptor antagonists upon DNA methylation**. 2016. 164f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Although depression presents a high incidence in the world population, currently available antidepressants exhibit a latency of 2-4 weeks to induce a significant improvement of symptoms and around 45% of patients do not respond to these drugs. On the other hand, it has been recently shown that ketamine, a NMDA receptor antagonist, induces a rapid and sustained antidepressant effect in animals and patients. However, the use of this drug for depression treatment has several limitations and, thus, the understanding of the mechanisms underlying its antidepressant action could present a significant importance for the development of new and better therapeutic alternatives. These mechanisms appear to be more complex than the initial blockade of the NMDA receptor, since such blockade by MK-801, for example, reduces the immobility time of mice submitted the forced swimming test (FST) for up to 3 hours, without reproducing the sustained effects of ketamine. Therefore, the cascade of neurochemical events that are initiated after ketamine administration that culminate in the regulation of gene expression and syntehsis of proteins related to neuronal plasticity has been the focus of intense investigation. These genes, in turn, can be modulated by epigenetic mechanisms such as DNA methylation, a process performed by DNA methyltransferase (DNMTs), which has also shown a high relevance to the neurobiology of depression and its treatment. Based on that, the present study aimed at investigating the effects induced by ketamine and MK-801, at doses and treatment protocols that promote antidepressant-like effect in the FST, upon DNA methylation in brain structures of animals submitted or not to the forced swim stress. The first experimental protocols were designed for the analysis of acute and sustained drug-induced antidepressant-like effects: In rats, acute systemic administration of S(+)-Ketamine 10 mg/Kg or MK-801 0.025 mg/Kg 23 hours after the pretest session and 1 hour or 7 days before the test session of FST was investigated. Based on these protocols, the effects of stress (FST) and of treatment with NMDA receptor antagonists were investigated on global DNA methylation levels and DNMT3a and Dnmt3b expression in the rat frontal cortex, ventral and dorsal hippocampus. Both, stress and treatment, induced changes in DNA methylation and DNMT3 expression in some of the brain regions analised. In addition, treatment with MK-801 and ketamine seem to induce differential effects in some areas, which could also be associated with different effects that they present on antidepressant action.

Keywords: Antidepressant, NMDA, ketamine, MK-801, DNA methylation, FST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da administração sistêmica de fluoxetina, S(+)-ketamina ou MK-801 sobre o comportamento de camundongos submetidos, 30 minutos depois, ao FST.....48

Figura 2. Efeito da administração sistêmica de fluoxetina ou S(+)-ketamina sobre o comportamento de camundongos submetidos, 7 dias depois, ao FST.. 50

Figura 3. Efeito da administração sistêmica de ketamina sobre o comportamento de camundongos submetidos, 24 depois, ao FST. 52

Figura 4. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina ou (±)-ketamina 10 mg/Kg, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de ratos submetidos, 24 horas depois, ao FST (n=6/grupo). 53

Figura 5. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina ou (±)-ketamina 10 mg/Kg em ratos expostos, após 1 hora, ao FST **(T1)** ou reexpostos 24 horas ou 7 dias depois do tratamento (**T2** e **T3**, respectivamente) (n=12-14/grupo).....55

Figura 6. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina sobre o comportamento de ratos submetidos, 7 dias depois, ao FST.....56

Figura 7. Efeito da administração sistêmica de MK-801 sobre o comportamento de ratos submetidos, 1 depois, ao FST. 57

Figura 8. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina (10 mg/Kg) ou MK-801 (0,025 e 0,1 mg/Kg) em ratos expostos, após 1 hora, ao OFT.....59

Figura 9. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg em ratos expostos, após 7 dias, ao FST (n=5-6/grupo). 60

Figura 10. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg em ratos expostos, após 7 dias, ao OFT. 62

Figura 11. Desenho experimental do estudo. 77

Figura 12. Efeito rápido do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre os níveis de metilação global do DNA no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos. 82

Figura 13. Efeito sustentado do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre os níveis de metilação global do DNA no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos. 84

Figura 14. Efeito rápido do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre a expressão de DNMT3a no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos.....86

Figura 15. Efeito rápido do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre a expressão de DNMT3b no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos.....88

Figura 16. Efeito sustentado do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre a expressão de DNMT3a no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos.....90

Figura 17. Efeito sustentado do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre a expressão de DNMT3b no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos.....92

Figura 18. Imagem representativa do *Western Blotting* realizado para avaliar a eficiência da técnica de extração de proteínas nucleares e citosólicas.....132

Figura 19. Imagens representativas das análises conduzidas para quantificação da expressão de DNMTs por *Western Blotting*. 133

Figura 20. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no córtex frontal (CF) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK).....134

Figura 21. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no hipocampo ventral (HV) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). 135

Figura 22. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no hipocampo dorsal (HD) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). 136

Figura 23. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no córtex frontal (CF) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK).....137

Figura 24. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no hipocampo ventral (HV) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). 138

Figura 25. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no hipocampo dorsal (HD) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). 139

Figura 26. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no córtex frontal (CF) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). 140

Figura 27. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no hipocampo ventral (HV) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK).....141

Figura 28. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no hipocampo dorsal (HD) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK).....142

Figura 29. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no córtex frontal

(CF) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). 143

Figura 30. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no hipocampo ventral (HV) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). 144

Figura 31. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no hipocampo dorsal (HD) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). 145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	ácido α-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiônico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro *(Brain Derived Neurotrophic Factor)*
CPF	Córtex pré-frontal
CpG	Citosina-fosfato-guanina (*Cytosine-phosphate-guanine)*
DNA	Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid)*
DNMT	DNA metiltransferase
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de transtornos mentais - V edição *(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)*
ECT	Eletroconvulsoterapia
eEF2	Fator de elongação eucariótico 2 (*eucaryotic elongation factor 2)*
ELISA	Ensaio de imuno-adsorção ligado à enzima *(enzyme-linked imunossorbent assay)*
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
FSL	Modelo animal genético de depressão *(Flinders Sensitive Line)*
FST	Teste do Nado Forçado (*Forced Swimming Test)*
GABA	Ácido gama-aminobutírico *(Gamma-AminoButyric Acid)*
GR	Receptor glicocorticóide
HAT	Histona acetiltransferase
HD	Hipocampo Dorsal
HDAC	Histona deacetilase
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HV	Hipocampo Ventral
LH	Desamparo aprendido *(Learned Helplessness)*
MBP	Proteínas de ligação a CpGs metilados (*Methyl-CpG binding proteins)*

mGlu	Receptor glutamatérgico metabotrópico
miRNA	microRNA, molécula de RNA não codificante
mTOR	Proteína alvo da Rapamicina em mamíferos *(Mammalian Target of Rapamycin)*
NMDA	N-metil-D-aspartato
NS	Não estressado
OFT	Teste do Campo Aberto *(Open Field Test)*
PBS	Tampão fosfato-salino *(phosphate buffered saline)*
PCP	Fenciclidina
PT	Pré-teste do teste do nado forçado
RNA	Ácido ribonucleico *(Ribonucleic Acid)*
RNAm	RNA mensageiro
SNC	Sistema nervoso central
ST	Estressado
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de Figuras iii
Lista de abreviaturas e siglas vi

1. INTRODUÇÃO 2

1.1. Depressão 2
1.1.1. Prevalência e Sintomas 2
1.1.2. Etiologia: Envolvimento de fatores genéticos e ambientais 3
1.1.3. Modelos animais sensíveis aos antidepressivos 5
1.1.4. Substratos neurais: Envolvimento do hipocampo e do córtex pré-frontal 7
1.1.5. Da neurobiologia às estratégias de tratamento: Além das monoaminas 9

1.2. Neurotransmissão Glutamatérgica 11
1.2.1. Glutamato e receptores NMDA 11
1.2.2. Neurotransmissão Glutamatérgica e Depressão 13

1.3. Epigenética 20
1.3.1. Mecanismos Epigenéticos 20
1.3.2. Epigenética e Depressão 24

1.4. Depressão, neurotransmissão glutamatérgica e epigenética 28

1.5. Hipótese 31

2. OBJETIVOS 33

3. CAPÍTULO 1 35

3.1. Contexto 35

3.2. Material e Métodos 39
3.2.1. Animais 39
3.2.2. Drogas 39
3.2.3. Procedimentos experimentais 40
3.2.4. Desenho Experimental 42
3.2.5. Análise estatística 46

3.3. Resultados 47
3.3.1. Experimentos conduzidos com camundongos 47
3.3.2. Experimentos conduzidos com ratos 53

3.4. Discussão 63

4. CAPÍTULO 2 72

4.1. Contexto 72

4.2. Material e Métodos 73
4.2.1. Animais 73
4.2.2. Drogas 73
4.2.3. Procedimentos experimentais.....73
4.2.4. Desenho experimental 77
4.2.5. Análise estatística 80

4.3. Resultados 81

4.4. Discussão 93

5. CONCLUSÀO.....104

6. REFERÊNCIAS 106

7. APÊNDICES.....132

8. ANEXO.....147

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Depressão

1.1.1. Prevalência e Sintomas

A depressão é um problema de saúde pública que afeta centenas de milhões de pessoas no mundo, desde indivíduos na infância até a idade mais avançada (Greenberg *et al.*, 1993). Trata-se de um grave transtorno na sociedade atual, com estimativas de prevalência ao longo da vida atingindo 20% da população global (Krishnan e Nestler, 2008; Nestler *et al.*, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, essa é uma das doenças mais onerosas para a sociedade, com altos custos sociais e pessoais, diminuição da produtividade no trabalho e aumento na utilização dos serviços de saúde (Katon, 2003; Nemeroff, 2007; Simon, 2003), com projeções para, em 2030, ser a principal causa de incapacitação mundial (Briley e Lépine, 2011).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de transtornos mentais - V edição (DSM-V, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) o diagnóstico clínico da depressão deve estar associado ao número e duração dos sintomas presentes, de tal forma que o indivíduo deve apresentar, por um período de duas semanas consecutivas ou mais, cinco ou mais sintomas, incluindo: anedonia e/ou humor deprimido (necessariamente), 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). Com isso, pacientes com depressão apresentam uma diminuição na qualidade de vida, com altas taxas de comorbidade e mortalidade, acarretando em diversas consequências sociais, psicológicas, físicas e econômicas, além de propiciar uma alta taxa de suicídio (Duman e Voleti, 2012; Nemeroff e Owens, 2002; Nemeroff, 2007; Tierney, 2007).

1.1.2. Etiologia: Envolvimento de fatores genéticos e ambientais

Embora a etiologia da depressão não seja completamente conhecida, sabe-se que possui um componente genético e um componente ambiental (Sullivan *et al.*, 2000). Quanto ao seu componente genético, estudos mostram, ao longo dos últimos anos, uma possível relação entre a ocorrência da depressão e indivíduos portadores de determinados genótipos (Lee *et al.*, 2013; Ripke *et al.*, 2013). Há evidências, por exemplo, de que um polimorfismo no gene que codifica o transportador da serotonina seria capaz de aumentar a sensibilidade de indivíduos a eventos aversivos e, assim, predispor indivíduos ao desenvolvimento de transtornos afetivos. Contudo, esse polimorfismo não seria suficiente para causar a depressão, tendo apenas um caráter modulatório sobre o fator ambiental (Caspi *et al.*, 2003). Além disso, até o momento, nenhum gene foi reconhecido como fator determinante para a ocorrência da doença (Holmans *et al.*, 2007; Nestler *et al.*, 2002).

Corroborando esses dados, estudos com gêmeos estimam que a depressão está relacionada a um fator hereditário em cerca de 37% dos casos (Sullivan *et al.*, 2000). Isso sugere que mesmo que fatores genéticos possuam um papel significante para o desenvolvimento da depressão, esta não pode ser considerada uma desordem genética, já que cerca de dois terços dos fatores envolvidos não são explicados por uma variabilidade em tal componente (Kennedy e Gorwood, 2013). Esses encontros suportam, assim, a hipótese de um modelo de interação gene-ambiente para o desencadeamento de episódios depressivos, abordagem que tem recebido crescente atenção com o surgimento da “epigenética” (Chiriţă *et al.*, 2015), a qual também será abordada posteriormente no presente estudo.

De fato, a importância de um componente ambiental para a etiologia da depressão parece ser um consenso geral e bem validado. Nesse sentido, evidências indicam uma associação significativa entre episódios depressivos e eventos de estresse que ocorrem durante a vida, relacionando este como o principal fator capaz de predispor um indivíduo ao desenvolvimento de tal desordem (Kendler *et al.*, 2001; Kessler, 1997; Post, 1992). De acordo com essa premissa, Post (1992) verificou que em cerca de 60% dos casos descritos na literatura os episódios de depressão eram precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial.

A exposição aos fatores estressantes acarreta alterações funcionais em diferentes sistemas de neurotransmissão, peptídeos e hormônios, a fim de manter a homeostase do organismo (Castrén, 2005; Joëls e Baram, 2009; Wurtman, 2005). Sob essas condições, um dos principais sistemas mobilizados é o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) (Schwabe *et al.*, 2012), o qual, quando ativado, culmina com a liberação de glicocorticoides a partir da glândula adrenal. Essa resposta, por sua vez, está sob controle inibitório dos próprios glicocorticóides que realizam retroalimentação negativa sobre a atividade do eixo através da ativação de receptores específicos localizados em diferentes locais do sistema nervoso central (SNC), incluindo o próprio hipotálamo e estruturas intimamente relacionadas à neurobiologia da depressão, como o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (Carrasco e Kar, Van de, 2003; Herman e Cullinan, 1997; Jacobson e Sapolsky, 1991).

No entanto, a exposição a um estresse intenso ou prolongado pode comprometer o controle da atividade do eixo HPA e levar a exposição do organismo a níveis excessivos de glicocorticóides e outros mediadores da resposta ao estresse (Holsboer *et al.*, 1995). O mesmo parece ocorrer na depressão, dado que, frequentemente, pacientes deprimidos apresentam hiperatividade do eixo HPA (Juruena *et al.*, 2006; Pariante, 2009). Por fim, a hipersecreção de glicocorticoides pode causar danos morfológicos e funcionais em diferentes estruturas encefálicas importantes para a regulação do afeto e do humor, exercendo diversos efeitos na emoção e cognição (Holsboer *et al.*, 1995; López *et al.*, 1999).

O tratamento crônico, mas não agudo, com antidepressivos de diferentes classes atenua os efeitos do estresse sobre o eixo HPA, bem como atenua a hipercortisolemia em pacientes deprimidos (Nickel et al., 2003; Nikisch et al., 2005; Schmid et al., 2006; Schüle et al., 2009). Alem disso, evidências indicam que o tratamento com antidepressivos atenua os prejuízos morfológicos observados no hipocampo e CPF de pacientes deprimidos (Sheline et al., 2003; Sheline et al., 1996). Assim, as alterações comportamentais e moleculares induzidas pela apresentação do estresse, bem como a prevenção de tais alterações pelo tratamento crônico com drogas antidepressivas, têm sido estudadas com o intuito de melhor compreender os mecanismos neurais subjacentes à neurobiologia da depressão (Mcarthur e Borsini, 2006).

1.1.3. Modelos animais sensíveis aos antidepressivos

Dado o panorama acima abordado relativo à depressão e sua etiologia, tem-se a grande necessidade do entendimento das bases moleculares, genéticas e epigenéticas que podem desencadear o seu desenvolvimento, com uma melhor compreensão entre os fatores genéticos e ambientais envolvidos em sua patofisiologia (Nestler *et al.*, 2002). No entanto, existe uma grande dificuldade em se estudar tais fenômenos clinicamente, devido às questões éticas e de viabilidade experimental que impedem a aplicação, padronização e controle de modelos humanos para tal (van der Staay, 2006). Assim, tem-se a importância e razão do desenvolvimento de modelos animais para esses estudos.

Os modelos animais são amplamente utilizados atualmente para o estudo da depressão, permitindo 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 neuronial e os processos neurológicos (van der Staay, 2006). Constituem, ainda, uma importante ferramenta para o estudo e desenvolvimento de novos fármacos para o sistema nervoso central, pois possibilitam reproduzir aspectos do transtorno comportamental estudado (como anedonia), obter informações sobre as drogas que podem tratar tal transtorno e identificar novos alvos moleculares que podem ser usados para o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos (Mcarthur e Borsini, 2006).

Um dos maiores problemas para se desenvolver modelos animais é a dificuldade, ou até mesmo a impossibilidade, de simular todas as mudanças comportamentais de humanos nos animais, uma vez que a depressão é uma desordem heterogênea e com sintomas centrais subjetivos (Mcarthur e Borsini, 2006). Por isso, alguns critérios foram estabelecidos para validação de tais modelos, dividindo-se em: 1) Validade de face ou semelhança: similaridade entre o comportamento exibido pelo animal e sintomas específicos da desordem em humanos; 2) Validade preditiva: resposta aos mesmos fármacos que são eficazes na clínica para a doença, diferenciando falsos-positivos e falsos-negativos; 3) Validade de constructo: semelhança entre a interpretação teórica do modelo e os conhecimentos sobre a neurobiologia do distúrbio (Willner, 1984). Entretanto, mesmo com esses critérios estabelecidos, ainda não existe um modelo animal

totalmente validado e que abranja todas as características da depressão, dada a dificuldade de se reproduzir em animais muitos dos seus sintomas principais, como humor deprimido e sentimento de culpa (Cryan e Slattery, 2007; Nestler *et al.*, 2002).

Lembrando-se da estreita relação existente entre a depressão e o estresse, a maioria dos modelos animais utilizados e conhecidos atualmente para o estudo desse transtorno envolve a exposição a um evento estressante inescapável, seguida de análises comportamentais, fisiológicas e moleculares (Mcarthur e Borsini, 2006; O'Neil e Moore, 2003). Como resultado dessa exposição ao estresse, o animal apresenta alterações comportamentais, manifestadas por baixa capacidade de reação frente a nova situação aversiva, como a imobilidade no nado forçado ou falha em escapar de choques (Overmier e Seligman, 1967; Porsolt *et al.*, 1977; Seligman e Beagley, 1975). Essas consequências, por sua vez, podem ser impedidas ou revertidas com o tratamento agudo ou crônico (dependendo do paradigma empregado) com fármacos utilizados na clínica para o tratamento da depressão (Porsolt *et al.*, 1977; Porsolt *et al.*, 1978; Sherman *et al.*, 1979).

Dentre os paradigmas mais amplamente utilizados, destaca-se o Teste do Nado Forçado (FST*,* do inglês *Forced Swimming Test*). Esse é um teste de boa reprodutibilidade e baixo custo, que não requer equipamentos sofisticados para sua execução (Slattery e Cryan, 2012) e possui uma elevada validade preditiva para a detecção de drogas antidepressivas em uso na clínica (Mcarthur e Borsini, 2006; Morilak e Frazer, 2004; O'Neil e Moore, 2003). Além disso, permite replicar outros achados clínicos, sendo de fato útil para compreender melhor o neurocircuito envolvido na depressão, bem como avaliar atividade antidepressiva e mecanismo de ação de fármacos (Duman e Monteggia, 2006; Slattery e Cryan, 2012).

Porsolt e colaboradores (1977) foram os primeiros pesquisadores que descreveram o FST com ratos e, posteriormente, com camundongos. Eles observaram que esses animais, quando expostos a um cilindro cheio de água, em um ambiente inescapável, adotam inicialmente um comportamento de escape intenso, mas logo assumem uma postura passiva de comportamento imóvel. Observaram, ainda, que especificamente drogas antidepressivas eram capazes de reduzir o tempo de imobilidade dos animais, aumentando o comportamento de escape (Porsolt *et al.*, 1977). Corroborando essas observações, atualmente já está bem estabelecido que antidepressivos clássicos, atípicos (Mcarthur e Borsini, 2006)

e até mesmo drogas com potencial antidepressivo, como antagonistas do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) (Li *et al.*, 2010), promovem redução do tempo de imobilidade dos animais tratados e expostos ao FST. Vale considerar que para a correta interpretação de uma redução do tempo de imobilidade como um comportamento relacionado ao afeito tipo-antidepressivo da substância testada, deve-se excluir um possível efeito estimulante da atividade locomotora, tal como ocorre com uso de psicoestimulantes (Hunt *et al.*, 2006), caso contrário os resultados poderiam decorrer em falso-positivos.

Por outro lado, embora apresente uma alta validade preditiva, o FST carece da validade de face, pois não permite observar os sinais e sintomas propriamente ditos da depressão, sendo que a variável dependente analisada parece ser uma resposta ao estresse agudo do nado forçado e não ao fenótipo do animal (Castagné *et al.*, 2009). Além disso, carece de validade de constructo, dado que a patogênese da depressão é um processo lento, que é frequentemente (mas não sempre) precipitado pela incapacidade de lidar com eventos estressantes (Spinhoven *et al.*, 2010). Não obstante a essas limitações, ainda permanece sedo um dos testes mais utilizados para se estudar mecanismo de ação de antidepressivos devido à sua facilidade de execução e alta reprodutibilidade dos dados entre diferentes laboratórios.

1.1.4. Substratos neurais: Envolvimento do hipocampo e do córtex pré-frontal

Por volta de 1930 e 1940 o circuito de controle emocional começou a ser identificado e o conjunto de estruturas encefálicas responsável pela elaboração das emoções recebeu a denominação de “sistema límbico” (Price e Drevets, 2009). Inicialmente, sabia-se que estruturas como hipocampo, amígdala, tálamo, giro cingulado e hipotálamo faziam parte deste sistema (Price e Drevets, 2009). Algum tempo depois, com o desenvolvimento de novos métodos de marcação e transporte axonal, outras estruturas do sistema nervoso central também foram identificadas como importantes para o controle emocional, como o córtex, por possuir intensas e difusas conexões com estruturas do sistema límbico (Krettek e Price, 1977).

A natureza heterogênea da depressão sugere que sua fisiopatologia esteja associada com o envolvimento de múltiplas regiões encefálicas, as quais podem

estar agindo como mediadores da diversidade de sintomas apresentados nessa doença. De fato, estudos de neuroimagem revelam diferenças estruturais e funcionais em estruturas encefálicas de pacientes com depressão quando comparados a indivíduos não-deprimidos (Berton e Nestler, 2006; Krishnan e Nestler, 2008; Nestler *et al.*, 2002; Price e Drevets, 2009). Observa-se, principalmente, o envolvimento do hipocampo e do córtex pré-frontal (CPF), possivelmente associados às disfunções cognitivas e emocionais presentes nesse transtorno. Da mesma forma, anormalidades no núcleo *accumbens* e no hipotálamo têm sido relacionadas, respectivamente, aos aspectos motivacionais da depressão (como a anedonia) e às alterações de sono e apetite (Drevets, 2001; Mayberg, 2003).

Nesse contexto, a evidência mais consistente encontrada na literatura parece ser um volume reduzido do CPF e do hipocampo em pacientes com depressão, o que pode ser inversamente correlacionado à severidade dessa doença (Banasr *et al.*, 2007; MacQueen e Frodl, 2011; Price e Drevets, 2009). Esse dado, somado a evidências de que tais estruturas possuem receptores para corticosteroides e modulam de alguma forma a atividade do eixo HPA (Jankord e Herman, 2008), suportam a existência de uma associação entre o hipocampo e o CPF com a resposta adaptativa ao estresse e desenvolvimento da depressão.

Corroborando isso, estudos mostram que a exposição de roedores a um estresse crônico causa atrofia e perda de neurônios e glia no CPF e hipocampo destes (Banasr *et al.*, 2007; Duman e Monteggia, 2006; McEwen, 2007; Shansky e Morrison, 2009), sendo a atrofia de neurônios caracterizada pela diminuição do número e comprimento da arborização dendrítica, bem como diminuição na densidade de espinhas sinápticas (Liu e Aghajanian, 2008; McEwen, 2007; Shansky e Morrison, 2009). Por outro lado, tais alterações induzidas pelo estresse em ambas as estruturas podem ser atenuadas pelo tratamento crônico com antidepressivos, o que tem se mostrado necessário para o efeito comportamental desses fármacos (Castrén e Rantamäki, 2010; Harmer *et al.*, 2006; Koenigs *et al.*, 2008).

Com relação ao hipocampo, vale destacar ainda que, apesar de ser uma estrutura unitária, pode ser separada em duas sub-regiões: dorsal e ventral. Evidências sugerem diferenças funcionais e neuroquímicas para tais porções, além da expressão diferenciada de alguns genes e receptores nas camadas das células

piramidais (Kheirbek e Hen, 2011; Leonardo *et al.*, 2006; Pandis *et al.*, 2006), dissociação suportada, ainda, pela diferente conectividade anatômica das duas sub-regiões. Dessa maneira, as funções exercidas pelo hipocampo parecem estar distribuídas de maneira praticamente segmentada ao longo do seu eixo dorsoventral (Bannerman *et al.*, 2004), sugerindo-se, assim, que essas porções poderiam processar as informações de maneiras distintas, inclusive na resposta ao estresse e ao tratamento com antidepressivos (Tanti e Belzung, 2013).

1.1.5. Da neurobiologia às estratégias de tratamento: Além das monoaminas

Na contramão da extrema relevância constante às evidências apresentadas até aqui, o entendimento da neurobiologia da depressão parece estar muito além do conhecimento da sua etiologia genética-ambiental e sua íntima relação com fatores estressantes ou alterações morfo-funcionais em substratos neurais. Nesse sentido, as tentativas de uma melhor compreensão sempre caminharam em paralelo aos esforços em se tentar abordagens antidepressivas mais eficientes.

Os primeiros antidepressivos foram descobertos ao acaso em meados do século XX, através de observações clínicas dos efeitos benéficos de fármacos sobre o humor. Um dos primeiros relatos foi feito por Selikoff e colaboradores (1952) ao observarem que a iproniazida, então usada no tratamento da tuberculose, melhorava o humor dos pacientes. Pouco tempo depois, efeito similar foi observado em pacientes tratados com imipramina (composto desenvolvido inicialmente como antipsicótico) (Kuhn, 1957) e, então, o efeito antidepressivo destes fármacos foi confirmado em pacientes deprimidos (Azima e Vispo, 2006; Loomer *et al.*, 1957). Posteriormente, descobriu-se que o mecanismo de ação dessas drogas envolvia a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica no sistema nervoso central (Axelrod e Inscoe, 1963; Glowinski e Axelrod, 1964; Zeller e Barsky, 1952).

Corroborando esses dados, observou-se que a reserpina (um anti-hipertensivo que provocava depleção de noradrenalina) induzia quadros depressivos como efeito secundário e que os níveis dos principais metabólitos da noradrenalina e serotonina estavam diminuídos na urina ou no líquor de pacientes deprimidos. Com isso, foi proposta a “teoria monoaminérgica clássica da depressão”, a qual preconiza que o

desenvolvimento desse transtorno está intimamente relacionado a uma deficiência na neurotransmissão noradrenérgica e/ou serotoninérgica. Os antidepressivos convencionais, por outro lado, atuam facilitando essa neurotransmissão após tratamento crônico, uma vez que inibem a recaptação ou a metabolização de monoaminas (Coppen *et al.*, 1972; Schildkraut e Kety, 1967). Desde então, inúmeros trabalhos têm suportado o envolvimento das monoaminas no efeito dos fármacos antidepressivos (Castrén, 2005), inclusive demonstrando que a depleção desses neurotransmissores abole o efeito antidepressivos em pacientes que estavam em remissão após tratamento crônico (Delgado *et al.*, 1990; Heninger 1996).

Ainda hoje, os antidepressivos prescritos para uso clínico, como os tricíclicos e os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, são fármacos que atuam por um mecanismo baseado na hipótese monoaminérgica. No entanto, tais fármacos apresentam uma latência de 2-4 semanas após o início do tratamento para induzir uma melhora significativa dos sintomas e apenas 60-65% dos pacientes respondem ao tratamento inicial, com menos da metade destes atingindo remissão ou tornando-se livres de sintomas (Rosenzweig-Lipson *et al.*, 2007).

Uma vez que o efeito farmacológico no metabolismo das monoaminas é essencialmente imediato, a latência para o efeito sugere que o aumento nos níveis de monoaminas *per se* não é o fator responsável pelo resultado observado na clínica. Então, adaptações graduais desenvolvidas a partir da facilitação da neurotransmissão monoaminérgica parecem mediar a ação dos antidepressivos e, nesse sentido, um importante progresso tem sido feito com estudos que suportam a indução de alterações plásticas por esses fármacos (Nestler *et al.*, 2002).

A importância dessa associação observada entre o mecanismo de ação dos antidepressivos e a plasticidade neuronial deu origem à “hipótese neurotrófica (ou molecular) da depressão” (Castrén, 2005). As neurotrofinas são peptídeos que regulam o crescimento neural e a diferenciação ao longo do desenvolvimento cerebral, bem como a plasticidade dos neurônios e das células gliais, sendo importantes nas respostas aos danos neuroniais, na manutenção das conexões funcionais entre as células e na neurogênese (Nestler *et al.*, 2002). Assim, de acordo com essa hipótese, a depressão seria causada não simplesmente por uma depleção de monoaminas, mas por alterações plásticas envolvendo um prejuízo na expressão gênica ou nas funções mediadas por neurotrofinas como o fator neurotrófico

derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*). Isso levaria a disfunções nas redes neurais causando um prejuízo funcional que levaria também a um desequilíbrio na neurotransmissão monoaminérgica das estruturas límbicas, em conjunto, possivelmente, com outras alterações nos sistemas monoaminérgicos (Castrén, 2005). Nesse contexto, o tratamento repetido com antidepressivos restauraria esses prejuízos por meio da regulação da neurotransmissão monoaminérgica e subsequente regulação da expressão de genes como o do BDNF e a plasticidade celular (Castrén e Rantamäki, 2010; Kimpton, 2012).

Diante disso, além do bem estabelecido papel do sistema monoaminérgico, avanços nas pesquisas têm dado origem a novas abordagens para o mecanismo de ação dos antidepressivos, revelando associações com diversos outros fatores (como plasticidade e expressão gênica) e sistemas de neurotransmissão. De fato, o melhor entendimento desses mecanismos e vias pode contribuir substancialmente para uma melhor compreensão da neurobiologia da depressão e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (Wong e Licinio, 2001).

Nesse contexto, destacam-se aqui duas abordagens que estão sob foco de investigação atual e têm revelado importantes evidências para associações tanto com o mecanismo de ação dos antidepressivos clássicos como com a neurobiologia da depressão e a mediação de novos alvos terapêuticos para esse transtorno: a neuotransmisão glutamatérgica e os mecanismos epigenéticos.

1.2. Neurotransmissão Glutamatérgica

1.2.1. Glutamato e receptores NMDA

Embora não tenha sido reconhecido como um neutransmissor até a década de 80, muito depois do que os neurotransmissores monoaminérgicos, atualmente o aminoácido glutamato é aceito como o principal neutransmissor excitatório do SNC (Orrego e Villanueva, 1993). Assim, estando presente na maioria das sinapses neurais, é importante para a neurogênese, crescimento de neuritos, sinaptogênese e sobrevivência neuronal (Mattson, 2008), o que caracteriza um importante papel do

sistema glutamatérgico em muitas funções fisiológicas neuronais (Mattson, Gleichmann e Cheng, 2008; Popoli *et al.*, 2012; Verkhratsky e Kirchhoff, 2007).

Para exercer sua ação, em níveis pré e pós-sinápticos, após ser liberado na fenda sináptica, o glutamato pode interagir com uma série de receptores, classificados por suas características estruturais em metabotrópicos ou ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos, ligados à Proteína-G, exercem sua ação via segundo mensageiro e compreendem 8 subtipos de receptores (mGlu1 a mGlu8), divididos em três grupos conforme sua homologia estrutural e função farmacológica (Coutinho e Knöpfel, 2002), enquanto os receptores glutamatérgicos ionotrópicos apresentam três diferentes subgrupos: NMDA, AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiônico) e kainato (Meldrum, 2000).

Os receptores NMDA, tipos de receptores glutamatérgicos mais estudados, possuem uma estrutura tetramérica formada por diferentes combinações de subunidades que, juntas, formam um canal iônico, permeável principalmente ao cálcio (Paoletti *et al.*, 2013). Estes diferem-se parcialmente dos demais canais iônicos cuja abertura depende de ligante, pois para a abertura do seu canal, além do glutamato, há a necessidade da ligação de um aminoácido glicina ou D-serina, que funcionam como co-agonistas, e da prévia despolarização da membrana em que se encontra o receptor para que o íon Mg2+, que bloqueia o canal no potencial de repouso, seja deslocado (Stephenson, 2006).

As subunidades que formam esses receptores, por sua vez, são divididas de acordo com a homologia das suas sequências em três subfamílias conhecidas até o momento: GluN1, GluN2 e GluN3. A subunidade GluN1 é obrigatória para que o receptor NMDA seja funcional e abriga o sítio de ligação da glicina / D-serina, enquanto a GluN2 abriga o sítio de ligação para o glutamato e a GluN3 não possui um papel bem elucidado até o momento. Sabe-se, no entanto, que majoritariamente a estrutura do receptor NMDA é composta por duas subunidades GluN1 e duas GluN2 ou GluN3 com seus respectivos sítios de ligação (Paoletti *et al.*, 2013) e, ainda, no interior do canal, foram identificados dois outros sítios: o sítio “s” e o sítio da fenciclidina (PCP) (Maeng e Zarate, 2007).

Os papéis funcionais dos receptores NMDA são inúmeros, uma vez que quando ativados mobilizam uma grande quantidade de cálcio para dentro das células, culminando com a ativação de diversas vias intracelulares, o que garante

um papel de destaque destes na mediação de importantes funções da neurotransmissão glutamatérgica, como cognição, memória e plasticidade neural (Kugaya e Sanacora, 2005). No entanto, justamente por essa capacidade de mobilizar um grande influxo de cálcio extracelular, o receptor NMDA também é estudado como promotor de morte celular por excitotoxicidade quando o controle da excitação glutamatérgica é perdido (Léveillé *et al.*, 2008), o que implica em uma grande variedade de condições neuropatológicas, como a doença de Huntington, Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, esquizofrenia, epilepsia e depressão (Dong *et al.*, 2009; Sanacora *et al.*, 2008).

1.2.2. Neurotransmissão Glutamatérgica e Depressão

Desde a observação, na década de 50, que agentes anti-infecciosos com alguma atividade antagonista no receptor de glutamato do tipo NMDA (por exemplo, a D-cicloserina e a amantadina) promoviam uma melhora de humor em pacientes, crescentes evidências reportam uma importante interação entre o sistema glutamatérgico e a fisiopatologia da depressão (Paul e Skolnick, 2003; Sanacora *et al.*, 2003).

Sanacora e colaboradores (2004), por exemplo, através de estudos com ressônancia magnética, reportaram que pacientes com depressão apresentavam níveis corticais elevados de glutamato e reduzidos de GABA (Ácido Gama-Aminobutírico, principal neurotransmissor inibitório do SNC) quando comparados a indivíduos saudáveis. Os níveis elevados de glutamato, por sua vez, também foram detectados em estudos *post mortem* (Hashimoto *et al.*, 2007) e são consistentes com alterações observadas no sangue periférico e no fluido cérebro-espinhal de pacientes deprimidos, além de outros estudos *post mortem* também relacionarem alterações em receptores glutamatérgicos, como o NMDA, nesses pacientes (Hashimoto, 2009).

Sustentando essa interação encontram-se, ainda, diversos estudos com modelos animais. As primeiras evidências foram obtidas a partir da observação de que ratos expostos a um estresse inescapável apresentavam prejuízo da função mediada por receptores NMDA no hipocampo (Shors *et al.*, 1989) e, posteriormente, estudos também mostraram, por exemplo, que a exposição a eventos estressores

aumenta a liberação de glutamato no córtex pré-frontal e hipocampo desses animais (Moghaddam, 1993, 2002).

Por outro lado, os níveis elevados de glutamato são revertidos com o tratamento antidepressivo, sugerindo que o sistema glutamatérgico também pode estar relacionado ao mecanismo de ação dos antidepressivos convencionais (Maes *et al.*, 1998). Em culturas de células de linhagens neuroniais, por exemplo, foi observado que o tratamento com diferentes antidepressivos atenua o influxo de cálcio promovido pelo glutamato, indicando que a modulação sobre o receptor NMDA seria um efeito comum a antidepressivos de diferentes classes farmacológicas (Li *et al.*, 2006).

Além disso, estudos com animais demostram que antagonistas do receptor NMDA podem modular o sistema monoaminérgico em diversas regiões cerebrais (Löscher *et al.*, 1991) e, também, induzir efeito tipo-antidepressivo, conforme demonstrado já em 1990 por Trullas e Skolnick, através da exposição de camundongos tratados com diferentes antagonistas do receptor NMDA ao FST e o teste de suspensão pela cauda (Trullas e Skolnick, 1990). Posteriormente, outros estudos com animais submetidos a diferentes modelos de estresse, como o desamparo aprendido (LH, do inglês Learned Helplessness) e o estresse crônico variado, também demonstraram tal efeito após tratamento com diversos antagonistas desse receptor (Skolnick *et al.*, 2009; Skolnick, 2002), salientando a importância da neurotransmissão glutamatérgica para a neurobiologia da depressão e o seu potencial como alvo farmacológico de drogas antidepressivas.

Nesse contexto, destacam-se recentes resultados obtidos em estudos com o anestésico ketamina, um antagonista do receptor NMDA que, de forma surpreende, induz um efeito antidepressivo rápido e sustentado por até duas semanas em pacientes resistentes ao tratamento (Berman *et al.*, 2000; Zarate *et al.*, 2006). Assim, com potencial para revolucionar o tratamento clínico da depressão, a ketamina e os seus resultados incentivaram diversos outros trabalhos que vêm investigando o potencial antidepressivo de diferentes drogas que atuam sobre o sistema glutamatérgico (Duman e Aghajanian, 2014; Kugaya e Sanacora, 2005; Mathews *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012), levando os pesquisadores, inclusive, a denominar os antagonistas de receptores NMDA de antidepressivos do novo milênio (Li *et al.*, 2011; Skolnick, 1999).

1.2.2.1. Ketamina

A ketamina, um derivado do PCP, foi sintetizada por Calvin Stevens, em 1962, através de uma colaboração com a companhia farmacêutica Parke Davis, buscando compostos que apresentassem menos efeitos adversos halucinógenos do que o PCP para uso anestésico (Domino, 2010). Inicialmente denominado como "CI-581", o composto apresentou efeitos promissores em estudos com animais e foi selecionado para estudos em humanos, sendo posteriormente chamado de ketamina (Domino, 2010). Então, em 1965, foram publicados os primeiros resultados dos estudos clínicos com essa droga, demonstrando evidências animadoras para o seu efeito anestésico, o que culminou com a aprovação do seu uso em 1970 (Domino *et al.*, 1965).

No entanto, o efeito da ketamina revelou-se pela indução de um tipo de anestesia específico, denominado "anestesia dissociativa", que culminava também com um estado cataléptico nos pacientes, os quais podiam, por exemplo, não responder a comandos, apresentar amnésia, permanecer de olhos abertos ou movimentar os membros involuntariamente (Garcia, 2008). Então, baseado nessas propriedades, atualmente, o uso da ketamina é permitido apenas quando ministrado por médicos e veterinários, com usual utilização para indução e manutenção da anestesia em procedimentos cirúrgicos variados, principalmente com pacientes comprometidos e/ou que não cooperam (Green e Krauss, 2000), sendo designada como agente de preferência em certos procedimentos de emergência relativamente comuns, como, por exemplo, condições de fratura que requerem sedação em pacientes pediátricos (Jamora e Iravani, 2010).

Convém ressaltar, ainda, que a ketamina pode produzir efeitos colaterais significativos relacionados à dose utilizada e duração do seu efeito, incluindo efeitos psicomiméticos, aumento da pressão sanguínea e intracraniana e secreções excessivas nas vias aéreas. Estes podem ser atenuados com a administração prévia de certos fármacos, porém, a indução de efeitos psicomiméticos acabou levando ao uso indevido da ketamina como droga de abuso, também denominada popularmente pelos usuários recreacionais de "Special K", "Vitamina K" ou simplesmente "K" (Dillon *et al.*, 2003; Jansen e Darracot-Cankovic, 2001).

O mecanismo primário de ação da ketamina dá-se por um antagonismo não-competitivo do receptor NMDA. Dessa forma, ligando-se ao sítio do PCP, localizado

no interior do canal iônico, ocorre a inibição da neurotransmissão excitatória mediada por glutamato, resultando nas propriedades farmacológicas responsáveis por sedação, hipnose e analgesia (Maeng e Zarate, 2007). No entanto, sua neurofarmacologia parece ser mais complexa, dado evidências de que além de interagir com o receptor NMDA essa droga também pode interagir com outros tipos de receptores em diversos locais de ligação, como os receptores de glutamato não-NMDA, opiódes, gabaérgicos e serotonérgicos, além de agir, direta ou indiretamente, sobre as monoaminas (acetilcolina, noradrenalina e dopamina) e divergirem de outras substâncias anestésicas por não interagirem com receptores GABA (Hirota e Lambert, 1996).

Com relação às suas propriedades químicas, a Ketamina, ou 2-(o-clorofenil)-2-(metilamino)- cicloexanona, é uma arilcicloalquilamina com peso molecular de 238 daltons e pKa 7,5 que se apresenta como dois isômeros opticamente ativos (enantiômeros), o S(+) e o R(-), associados aos conservantes cloreto de benzetônio e clorbutanol (Kohrs e Durieux, 1998). Disponível comercialmente em diferentes preparações químicas e farmacêuticas, constitui-se, principalmente, de uma mistura racêmica (iguais proporções dos isômeros S(+) e R(-); (±)-ketamina), mas também são cada dia mais acessíveis formulações dos enantiômeros puros S(+) ou R(-). Esses enantiômeros, por sua vez, diferem em cinética e dinâmica na interação com o receptor NMDA, de tal forma que a S(+)-ketamina apresenta uma afinidade aproximadamente 4 vezes maior por esse receptor e uma maior potência anestésica se comparada ao isômero R(-), além de ser 2 vezes mais potente que a forma racêmica para prevenir a sensibilização central da medula espinhal (Domino, 2010).

A ketamina apresenta alta lipossolubilidade e fraca ligação às proteínas plasmáticas (10 a 30%), resultando em grande volume de distribuição, e ação muito rápida, ultrapassando facilmente a barreira hematoencefálica. Além disso, possui uma meia-vida de distribuição curta (2-4 minutos) e uma meia-vida de eliminação mais longa (2-4 horas) em humanos (Domino, 2010), o que é consistente com a rápida recuperação observada após anestesia intravenosa com essa droga (Mion e Villevieille, 2013). Seu metabolismo ocorre através de reações de oxidação pelas enzimas microssomais hepáticas, gerando três metabólitos ativos: norketamina, 5-OH-ketamina e 4-OH-ketamina, A norketamina é o principal metabólito ativo, embora apresente apenas de 20 a 30% da atividade da ketamina racêmica, e todos os

metabólitos são eliminados por excreção renal (Garcia *et al.*, 2008; Pfenninger *et al.*, 2002).

Essas características químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas da ketamina influenciam diretamente os seus efeitos no organismo e, nesse sentido, é notável que, além do seu uso como anestésico, este antagonista do receptor NMDA tem revelado grande potencial para estudo e uso dose-dependente em outras múltiplas situações clínicas, como por exemplo a dor (Aroni *et al.*, 2009) e a depressão (Hirota e Lambert, 2011).

1.2.2.1.1.Efeito antidepressivo da ketamina

Conforme já mencionado no presente estudo, recentemente tem sido demonstrado que a ketamina induz um efeito antidepressivo rápido e sustentado em pacientes resistentes ao tratamento (Mathews *et al.*, 2012), o que caracterizaria o potencial de uso dessa droga como uma estretégia terapêutica revolucionária para a depressão. No entanto, seu uso no tratamento clínico possui diversos desafios e necessita cautela, pois é uma droga alucinógena, com propriedades psicomiméticas e potencial de abuso (Browne e Lucki, 2013). Assim, o entendimento do mecanismo de ação subjacente ao efeito antidepressivo induzido pela ketamina pode apresentar uma importância significativa para a identificação de novos alvos moleculares e desenvolvimento de novos e melhores antidepressivos.

Muitos estudos têm demonstrado que doses sub-anestésicas de ketamina exercem um efeito antidepressivo rápido, robusto e de longa duração em animais e pacientes (Diazgranados *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Tizabi *et al.*, 2012). Murrough e colaboradores (2013), por exemplo, demonstraram em um extensivo estudo clínico, a eficácia da ketamina sobre a depressão resistente a outros tratamentos, em comparação com o benzodiazepínico midazolam (utilizado como placebo). Neste estudo, o efeito da ketamina perdurou por um período de 7 dias após o tratamento, corroborando os relatos de que os efeitos de uma única administração da droga podem ser mensurados por um período prolongado entre dias e semanas, uma característica farmacológica que distingue a ketamina dos demais antidepressivos.

Em estudos com animais, o efeito tipo-antidepressivo da ketamina tem sido confirmado em diversos modelos de depressão, como o FST, LH, teste de

suspenção pela cauda, teste de preferência por sacarose, dentre outros (Browne e Lucki, 2013). No FST, por exemplo, os efeitos prolongados da ketamina foram relatados como duradouros por 8 dias (Ma *et al.*, 2013), 10 dias (Yilmaz *et al.*, 2002), 12 dias (Garcia *et al.*, 2008) e 2 semanas (Maeng *et al.*, 2008). Interessante ressaltar que no LH, uma única administração de ketamina é capaz de reverter os déficits comportamentais induzidos pelo estresse 30-60 minutos (Beurel, 2011; Koike *et al.*, 2011) e 24 horas depois do tratamento (Li *et al.*, 2010; Maeng *et al.*, 2008), ao passo que o efeito das drogas antidepressivas convencionais é observado neste modelo apenas após tratamento repetido (5-7 dias) (Petty e Sherman, 1979).

No entanto, os mecanismos subjacentes à ação antidepressiva da ketamina parecem ser mais complicados do que simplesmente o bloqueio do receptor NMDA. O bloqueio desse receptor usando MK-801 ou CPP reduziu o tempo de imobilidade no FST por 3 e 24h, respectivamente, porém esses compostos não reproduziram os efeitos prolongados da ketamina com intervalos mais longos (Autry *et al.*, 2011). Assim, apesar de pouco ter sido identificado sobre o mecanismo de ação da ketamina até o momento, as hipóteses têm focado na cascata de eventos neuroquímicos que são iniciados logo após sua administração e persistem de maneira prolongada por dias após seu metabolismo e eliminação.

Nesse sentido, é postulado que o bloqueio dos receptores NMDA leva a uma desinibição da neurotransmissão glutamatérgica mediada pela diminuição do *feedback* inibitório GABAérgico no CPF, uma região amplamente implicada no desenvolvimento de desordens psiquiátricas (Homayoun e Moghaddam, 2007). O aumento do glutamato, por sua vez, ativa receptores ionotrópicos AMPA, resultando em influxo de Na2+ e subsequente despolarização da membrana, indução de cascatas de sinalização e síntese de proteínas. Assim, tem sido demonstrado, por exemplo, que antagonista do receptor AMPA (NBQX) bloqueia os efeitos antidepressivos da ketamina no LH (Koike *et al.*, 2011; Maeng *et al.*, 2008) e no FST (Autry *et al.*, 2011).

Além disso, dados sugerem que os efeitos antidepressivos prolongados da ketamina são mediados por alterações moleculares na via de sinalização da proteína alvo da rapamicina (mTOR, do inglês *Mammalian Target of Rapamycin*), uma quinase de serina/treonina que é expressa no desenvolvimento dendrítico e controla a síntese de novas proteínas (Duman e Voleti, 2012). Li e colaboradores (2010)

demonstraram que a ativação de mTOR no CPF subjaz os efeitos antidepressivos da ketamina em ratos e alguns estudos de caso também demonstram que a mTOR está ativada no sangue periférico de pacientes deprimidos após a administração aguda de ketamina (Denk *et al.*, 2011).

Considerando, então, o papel modulatório da mTOR sobre a síntese de proteínas, recentes estudos têm demostrado que a ativação de sua via pela ketamina aumenta a tradução de BDNF em regiões cerebrais como o hipocampo (Autry *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2008). Esta neurotrofina possui alta afinidade para o repector TrkB, ativando vias de sinalização que regulam crescimento e sobrevivência neuronal, além de regular a transcrição gênica através da ativação de fatores de transcrição como a proteína CREB (Martin e Finsterwald, 2011), importante para comportamentos afetivos, aprendizado e memória (Autry e Monteggia, 2012). Sendo assim, o BDNF poderia ser a base da resposta comportamental à ketamina, apresentando-se como um produto rápido provindo de múltiplas cascatas de sinalização.

Somado a isso, a ketamina também inibe a quinase do fator de elongação eucariótico 2 (eEF2, do inglês *eucaryotic elongation factor 2*), uma proteína dependente de cálcio que regula as vias da MAP-quinase e mTOR, possuindo um importante papel na regulação da plásticidade sináptica concomitante ao aumento na síntese de BDNF (Autry *et al.*, 2011). Convém lembrar que, conforme já mencionado no presente estudo, o BDNF apresenta uma expressão diminuída com a exposição ao estresse, o qual também induz atrofia dendrítica e reduz a neurogênese, particularmente no hipocampo, alterações neuroplásticas que são atenuadas pelo tratamento crônico com antidepressivo (Castrén, 2005; Duman e Monteggia, 2006; Krishnan e Nestler, 2008). Além disso, a neurogênese hipocampal e expressão de BDNF induzida por antidepressivos parecem ser necessárias para os efeitos comportamentais dessas drogas (Saarelainen *et al.*, 2003).

Tendo o exposto, em conjunto, as evidências sugerem que o mecanismo de ação subjacente ao efeito antidepressivo rápido e sustentado induzido pela ketamina envolve modificações moleculares em complexas vias de sinalização que culminam com alterações na expressão de genes e síntese de proteínas relacionadas aos processos de plasticidade neural.

1.3. Epigenética

1.3.1. Mecanismos Epigenéticos

O termo “epigenética” foi cunhado, na década de 40, por Conrad Waddington, referindo-se a todos os mecanismos necessários para o desdobramento do programa genético no desenvolvimento, ao tentar explicar como distintos tipos celulares e fenótipos poderiam ser gerados a partir de células contendo o mesmo genoma comum (Slack, 2002). Algum tempo depois, Nanney (1958) estendeu esse conceito relacionando o fenótipo como produto de dois sistemas, um genético e outro epigenético, sendo o último formado por outros constituintes que não os ácidos nucleicos. Desde então, a definição de epigenética vem sendo aprimorada ao longo dos anos, de tal forma que hoje é compreendida como o modo pelo qual as experiências e o ambiente podem acarretar alterações estáveis na estrutura da cromatina alterando a expressão gênica e a codificação de proteínas sem que haja alterações na sequência de bases do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Holliday, 2006).

Pode-se dizer, então, que o código genético é o código básico de programação, que pode ser modulado pelo epigenoma, com consequentes alterações no fenótipo. Dessa forma, embora a estrutura do DNA codifique toda a informação necessária para o estabelecimento de um organismo, alterações epigenéticas podem contribuir, por exemplo, para a modulação da expressão de genes tecido-específicos, integridade do genoma, coordenação da replicação, desenvolvimento embrionário, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X (Iacobuzio-Donahue, 2009; Turek-Plewa e Jagodziński, 2005). Isso revela a grande importância existente no estudo das alterações epigenéticas, o que pode se tornar ainda mais relevante ao se considerar uma possível transmissão destas para células filhas através de divisões mitóticas e meióticas (Egger *et al.*, 2004; Esteller, 2009). Além disso, existe um crescente número de evidências indicando o envolvimento dos mecanismos epigenéticos no estabelecimento e progressão de diversas patologias, como o câncer e transtornos psiquiátricos (Esteller, 2009; Tsankova *et al.*, 2007).

Os mecanismos epigenéticos, por sua vez, englobam: modificações covalentes no DNA (por exemplo metilação), modificações pós-traducionais da cauda N-terminal de histonas (por exemplo, metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação) e mecanismos não-transcricionais de silenciamento gênico (por exemplo, microRNAs ou miRNAs) (Kim *et al.*, 2009; Krishnan e Nestler, 2008). Dentre esses, dois são destacados como alvos principais para o estudos da regulação epigenética sobre a expressão gênica: modificações em histonas e metilação do DNA.

1.3.1.1. Modificações em Histonas

As células administram a expressão de genes através do empacotamento do DNA ao redor de cada octâmero de histona que forma os nucleossomos organizados na cromatina (Rodenhiser e Mann, 2006). Esse octâmero compreende duas cópias das proteínas histônicas altamente conservadas H2A, H2B, H3 e H4, as quais apresentam estrutura idêntica entre elas, sendo compostas por uma região interna hidrofóbica e uma região terminal formada por um grupo amina. Essas caudas amino-terminais, ricas em lisina, se estendem para fora do nucleossomo e são passíveis de modificações pós-transcricionais (Iacobuzio-Donahue, 2009).

Modificações em histonas estão intimamente associadas com mudanças na estrutura da cromatina, a qual pode se apresentar em dois estados conformacionais distintos: a heterocromatina, que se encontra em estado condensado e a eucromatina, que apresenta uma conformação mais distendida. Isso pode dificultar ou facilitar, respectivamente, o acesso da maquinaria transcricional a regiões promotoras específicas dos genes, resultando em mudança nos níveis de RNA mensageiro (RNAm; RNA: ácido ribonucleico) e de proteínas expressas (Krishnan e Nestler, 2008; Tsankova *et al.*, 2007, 2006). Assim, tem-se que as modificações em histonas regulam a indução de diferentes padrões de transcrição e expressão gênica.

O papel dessas modificações na regulação da expressão gênica foi descrito pela primeira vez na década de 60 por Allfrey e colaboradores (1964) ao observarem a acetilação e a metilação de histonas. Desde então, outras modificações em histonas envolvidas no controle da expressão gênica foram descobertas, dando origem ao que ficou conhecido como o “código das histonas” (Strahl e Allis, 2000).

Hoje sabe-se que existem pelo menos oito modificações em histonas: acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ribosilação de ADP, desaminação e isomerização de prolina (Huidobro *et al.*, 2013). Dentre essas, a acetilação e a metilação são as modificações mais estudadas.

O processo de acetilação de histonas ocorre principalmente nas histonas 3 (H3) e 4 (H4) e é obtido através do balanço de duas enzimas predominantes: histona acetiltransferase (HAT), que confere a adição de um grupo acetil ao grupo amina da lisina localizado na região terminal, e histona deacetilase (HDAC), responsáveis pela eliminação do mesmo, restabelecendo a carga positiva das caudas amino-terminais. Assim, a HAT reduz as interações entre os nucleossomas próximos, promovendo a ativação da cromatina (eucromatina) com consequente permissão da transcrição dos genes, enquanto a HDAC funciona no sentido oposto, possibilitando uma maior proximidade entre as histonas e o DNA, bloqueando os locais de ligação aos promotores e alterando a conformação da cromatina para um estado de repressão (heterocromatina), logo inibindo a transcrição de genes (Dell'Aversana *et al.*, 2012).

A metilação de histonas difere da acetilação por não se apresentar de forma tão linear. O papel da metilação em relação ao controle de transcrição gênica varia de acordo com o resíduo e a quantidade de grupos metil adicionados. A trimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3), por exemplo, está associada à eucromatina, enquanto a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) é uma marca enriquecida em heterocromatina (Bártová *et al.*, 2008).

1.3.1.2. Metilação do DNA

A metilação do DNA é um processo complexo pelo qual enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) catalisam a adição de um grupo metil (-CH3) do doador universal S-adenosil-L-metionina para a posição carbono-5 de citosinas pertencentes a dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina (CpGs, do inglês cytosine-phosphate-guanine) (Klose e Bird, 2006).

Essa é a alteração epigenética mais prevalente no genoma mamífero (Hendrich e Bird, 2000), sendo encontradas regiões hipermetiladas discretas, incluindo a maioria dos elementos repetitivos e elementos parasitas, e regiões hipometiladas (Bird, 2002; Suzuki e Bird, 2008). Com isso, influencia profundamente muitos

processos, como regulação transcricional, modulação da estrutura da cromatina e inativação do cromossomo X (Baylin *et al.*, 2001).

Existem ainda no genoma sequências curtas de DNA ricas em CpGs, conhecidas como ilhas CpGs, usualmente definidas como uma região com pelo menos 200 pares de bases, cujo conteúdo de citosinas e guaninas é igual ou superior a 50%, e que apresentam uma razão entre a frequência observada e a frequência esperada de dinucleotídeos CpGs igual ou superior a 0,6 (Gardiner-Garden e Frommer, 1987). Essas regiões são encontradas em locais próximos aos promotores de genes de expressão constitutiva e em 40% das regiões promotoras dos genes de expressão tecido-específica (Wang e Leung, 2004).

A ausência de metilação na região promotora dos genes pode ser um pré-requisito para a atividade transcricional destes (Jaenisch e Bird, 2003), dado que a metilação do DNA nessas regiões geralmente exerce um efeito repressivo na transcrição gênica. Esse efeito, por sua vez, parece regulado por diversos mecanismos, havendo duas hipóteses distintas para explicá-lo: inibição direta e inibição indireta. No primeiro caso entende-se que a ligação por parte dos fatores de transcrição às zonas que contém grande incidência de locais CpG metilados está impedida. Já a inibição indireta envolve interação com membros da família das proteínas de ligação a CpGs metilados (MBP, do inglês *Methyl-CpG binding proteins*), como MeCP2, MBD1-MBD4, as quais se associam a vários complexos de remodelamento da cromatina e atraem HDACs, que promovem a compactação da cromatina, resultando no impedimento da ligação de fatores de transcrição à região do promotor e, consequente, no silenciamento gênico (Boyes e Bird, 1992; Wade, 2001).

O processo de metilação do DNA é catalisado pela família das enzimas DNMTs que compreende cinco subtipos (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L), sendo que três delas são funcionais e amplamente estudadas: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A DNMT1 também é conhecida como uma metilase de manutenção, uma vez que atua predominantemente nos processos de divisão celular, fazendo a cópia do padrão de metilação pré-existente no DNA parental para o DNA da célula-filha. Já as DNMTs 3a e 3b também são denominadas metilases "*de novo*", uma vez que são as responsáveis por novas metilações em sequências CpG ainda não metiladas (Jeltsch, 2006).

Existem evidências de que, em certas condições fisiológicas específicas, ocorre um controle dinâmico da metilação do DNA catalisada pelas DNMTs através da sua reversão, também denominada desmetilação, porém o mecanismo para que isso ocorra não foi totalmente elucidado. Comparada com as modificações em histonas, que são em sua maioria consideradas facilmente reversíveis, a metilação do DNA é vista como uma alteração epigenética mais estável (Nestler *et al.*, 2015).

1.3.2. Epigenética e Depressão

Conforme já mencionado no presente estudo, eventos estressantes podem atuar como fatores de risco para o desenvolvimento da depressão. Assim, desde o desenvolvimento fetal até a adolescência, esses mecanismos ambientais, denominados estressores, são capazes de modificar uma pré-disposição geneticamente determinada ao desenvolvimento desse transtorno.

Os efeitos dos estressores (fisiológicos ou psicológicos) podem ser percebidos de diferentes formas entre os indivíduos, levando a respostas denominadas "resiliência" ou "susceptibilidade". Como exemplo disso existe uma série de estudos, incluindo o de Fossion e colaboradores (2013), com idosos sobreviventes do holocausto nazista que quando crianças sofreram eventos traumáticos. Em geral, os indivíduos expostos a traumas de infância se tornam menos capazes de lidar com outros traumas quando adultos, o que caracteriza uma diminuição da resiliência a partir de múltiplos traumas.

Nesse contexto, a epigenética insere-se como uma possível explicação para a base molecular das modificações genômicas que alteram a susceptibilidade (ou resiliência) e, consequentemente, os resultados clínicos observados. Essa hipótese é sustentada por recentes estudos pré-clínicos e clínicos que têm focado nos efeitos epigenéticos de diversos estressores ambientais identificados como fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos. Modificações epigenéticas têm sido reportadas, por exemplo, em modelos animais após exposição a estresse agudo (Fuchikami *et al.*, 2009), estresse crônico (Sterrenburg *et al.*, 2011; Tsankova *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2011; Wilkinson *et al.*, 2009), medo condicionado (Bredy *et al.*, 2007; Mizuno *et al.*, 2012), modelo de transtorno do estresse pós traumático (Roth *et al.*, 2011), dentre outros. Nesse sentido, foi demonstrado que o estresse

pode alterar o padrão e remodelamento da cromatina, tanto por acetilação quanto por metilação (Fuchikami *et al.*, 2009; Horard *et al.*, 2009).

Com relação aos mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese da depressão, um dos principais focos de pesquisa atual refere-se às alterações epigenéticas induzidas pela exposição precoce ao estresse. Evidências reportam, por exemplo, alterações na metilação do DNA em promotores de receptores glicocorticóides (GRs) e RNA ribossomal no cérebro de vítimas de suicidio com histórico de abuso infantil (McGowan e Kato, 2008; McGowan *et al.*, 2009), uma associação que é suportada por diversos estudos com modelos animais, como o conduzido por Champagne e colaboradores (2003), que mostraram que variações no cuidado materno nos primeiros anos de vida deixam marcas epigenéticas persistentes no organismo, o que sugere um caráter duradouro para essas modificações.

Assim, tem-se que a exposição ao estresse na fase inicial do desenvolvimento pode resultar em alterações epigenéticas persistentes no genoma capazes de alterar a expressão gênica e influenciar as funções neurais e comportamentais na fase adulta (Tsankova *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2004). De fato, estudos com roedores mostram que filhotes que recebem poucos cuidados maternos, quando comparados aos que recebem cuidados adequados, apresentam ansiedade aumentada e redução na expressão de receptores para glicocorticóides no hipocampo, cuja função encontra-se prejudicada em indivíduos deprimidos. Essa redução é mediada pelo aumento da metilação na região promotora do gene para esses receptores, reprimindo efetivamente a expressão deste e, consequentemente, a síntese de proteínas (Szyf *et al.*, 2007; Tsankova *et al.*, 2007).

Modificações no padrão de metilação do DNA de genes relacionados a depressão como o do BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro*,* do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor)* (Toledo-Rodriguez *et al.*, 2010), do GR (Mulligan *et al.*, 2012; Oberlander *et al.*, 2008; Radtke *et al.*, 2011) e do transportador de serotonina (Devlin *et al.*, 2010) também têm sido reportadas em crianças após a exposição das mães a estressores pré-natais, como tabagismo e depressão materna. Níveis elevados de metilação do DNA no gene para GR, por exemplo, foram detectados no sangue de recém-nascidos cujas mães apresentaram depressão nos três primeiros meses gestacional, sugerindo que a desregulação do eixo HPA, associada a

depressão (Holsboer, 2000), pode ser mediada por mecanismos epigenéticos (Oberlander *et al.*, 2008). Essa regulação da expressão de GRs, por sua vez, está frequentemente associada à neurobiologia da depressão (Gallagher *et al.*, 2009; Hunsberger *et al.*, 2009; Schüle *et al.*, 2009), de tal modo que o estresse reduz a expressão de GRs no hipocampo e o tratamento crônico com drogas antidepressivas aumenta essa expressão (López-Figueroa *et al.*, 1998).

Assim, os dados apresentados com modelos animais e humanos indicam que a exposição a estressores pré e pós-natais está associada com modificações epigenéticas em genes relacionados à neurobiologia da depressão. Somado a isso, essas alterações também tem sido reportadas em estudos *post mortem* e com pacientes deprimidos, revelando alterações na metilação do DNA e estado da cromatina em diversos genes como de receptores gabaérgicos (Poulter et al., 2008), sinapsinas (Cruceanu *et al.*, 2013) e transportador de serotonina (Philibert *et al.*, 2008), bem como alterações na expressão de RNAm para enzimas envolvidas em modificações epigenéticas, como as HDACs (Iga *et al.*, 2007). Além disso, atenção especial tem sido dada para modificações epigenéticas na via do BDNF (Boulle *et al.*, 2012), de tal modo que Fuchikami e colaboradores (2011), por exemplo, relacionaram o perfil de metilação do DNA do gene que codifica essa neurotrofina como potencial biomarcador diagnóstico para a depressão.

Considerando o exposto, fica claro a existência de um importante papel dos mecanismos epigenéticos na patogênese da depressão, uma relação que é suportada, ainda, por estudos que sugerem que a modulação epigenética da expressão gênica também está envolvida no mecanismo de ação de antidepressivos. Tsankova e colaboradores (2006), por exemplo, demonstraram que o tratamento crônico de camundongos com o antidepressivo imipramina leva a uma hiperacetilação de histona-H3 em regiões promotoras do BDNF no hipocampo desses animais, bem como diminuição dos níveis de RNAm para HDAC5, o que promove a reversão de certos efeitos deletérios promovidos pela exposição dos animais ao estresse crônico de derrota social. No entanto, uma super-expressão de HDAC5 bloqueia a eficácia desse fármaco em reverter o fenótipo tipo-depressivo dos animais, sugerindo que a regulação dessa enzima com consequente aumento da acetilação de histonas, associada à descondensação da cromatina e ativação da transcrição gênica, é essencial para a ação antidepressiva desse fármaco. Mais

recentemente, Zimmerman e colaboradores (2012) demostraram também que antidepressivos triciclicos e a paroxetina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) reduzem a atividade de DNMT1 em astrócitos do córtex de ratos, sem se ligarem diretamente a essa enzima, sugerindo que os antidepressivos também podem afetar a metilação do DNA de alguma maneira. Em camundongos expostos ao nado forçado, foi observado, ainda, que o tratamento com diferentes antidepressivos atenuou os efeitos desse estresse sobre a metilação de DNA em estruturas como CPF e hipocampo (Sales e Joca, 2016). Em outro modelo, o desamparo aprendido, foi observado que o tratamento crônico com o antidepressivo imipramina atenuou o aumento da metilação e expressão de DNMT3a no CPF em animais submetidos ao estresse (dados não publicados).

De forma complementar, estudos recentes indicam que drogas que agem modulando mecanismos epigenéticos também são capazes de induzir efeitos tipo-antidepressivo em modelos animais. Como exemplo disso, tem-se que a administração sistêmica de inibidores não-específicos da HDAC (butirato de sódio por exemplo) ou injeção direta de inibidores mais seletivos dessa enzima (MS-275 por exemplo), em diversas regiões cerebrais, incluindo nucleo accumbens, hipocampo, amígdala ou CPF, revertem os sintomas tipo-depressivos induzidos pela exposição de camundongos ao estresse crônico de derrota social (Covington *et al.*, 2009). Ademais, resultados do nosso grupo de pesquisa indicaram que a administração sistêmica e hipocampal de inibidores de DNMTs induz efeito tipo-antidepressivo no FST, associado com um aumento na expressão de BDNF hipocampal (Sales *et al.*, 2011).

Em conjunto, as evidências apresentadas indicam que a regulação de mecanismos epigenéticos como a acetilação de histonas e a metilação do DNA em estruturas encefálicas, com consequentes modificações na expressão gênica, possui um papel fundamental na adaptação dos individuos a estressores e na modulação do desenvolvimento de transtornos associados a esse fator de risco, como a depressão, podendo, ainda, ser fundamental para o mecanismo de ação de antidepressivos clássicos, bem como proporcionar novas abordagens terapêuticas para essa desordem.

1.4. Depressão, neurotransmissão glutamatérgica e epigenética

Considerando os diversos estudos clínicos e pré-clínicos que evidenciam uma relevante participação da epigenética e do sistema glutamatérgico sobre a neurobiologia da depressão e o mecanismo de ação de fármacos antidepressivos, bem como a possibilidade de interferência sobre tais abordagens para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para essa desordem, pode-se sugerir que, de alguma maneira, a epigenética e o sistema glutamatérgico poderiam estar associados para a promoção dos efeitos moleculares e comportamentais que têm sido relacionados, separadamente, a estas vertentes de estudo.

Nesse sentido, evidências sugerem que drogas que agem sobre os mecanismos epigenéticos parecem induzir alterações em alvos constantes à via de sinalização glutamatérgica. Um estudo conduzido por Nasca e colaboradores (2013), por exemplo, demonstrou que a administração de L-acetilcarnitina, um doador de grupo acetil, promove uma regulação epigenética de receptores mGlu2 e aumenta a síntese destes no hipocampo e CPF de ratos FSL (modelo genético de depressão, do inglês *Flinders Sensitive Line*). Tais receptores são localizados de forma preferencial nos terminais pré-sinápticos e modulam negativamente a liberação de glutamato quando ativados. Isso culminou na observação de um efeito tipo-antidepressivo quando esses animais foram expostos ao FST após tratamento com a L-acetilcarnitina, um efeito que, por sua vez, ocorreu de forma mais rápida e duradoura do que o observado após administração de clomipramina, um antidepressivo clássico.

Além disso, drogas que agem sobre o sistema glutamatérgico também podem induzir alterações epigenéticas em estruturas cerebrais. Sabe-se, por exemplo, que a ativação dos receptores mGlu2/3 pelo agonista LY379268 promove demetilação do DNA no CPF e hipocampo de camundongos (Matrisciano *et al.*, 2011) e que o MK-801, antagonista do receptor NMDA, aumenta a fosforilação de histona-H3 no CPF de ratos (Maćkowiak *et al.*, 2013). Essa inibição da sinalização do receptor NMDA pelo MK-801, assim como a inibição genética por um hipomorfismo de GluN1, ainda reduziu os níveis de um microRNA específico do cérebro, miR-219, no CPF de camundongos (Kocerha *et al.*, 2009). Então, lembrando que a metilação do DNA e os microRNAs levam a uma diminuição da expressão gênica e a acetilação de histonas a aumenta, os resultados, em conjunto, sugerem que o mecanismo de

ação dessas drogas para promoção de seus efeitos envolve um aumento da expressão gênica proveniente de alterações epigenéticas subsequentes à inibição da neurotransmissão glutamatérgica em estruturas cerebrais.

No entanto, os estudos que relatam a interação da epigenética com o efeito induzido por drogas que agem sobre o sistema glutamatérgico são escassos até o momento e a sua maioria, como os aqui citados, foram realizados com o uso de doses que causam efeitos psicomiméticos relacionados à neurobiologia da esquizofrenia, de tal forma que apenas recentemente surgiram as primeiras evidências constantes à essa interação associada ao uso de drogas e doses com efeito antidepressivo. De fato, o estudo da epigenética em desordens mentais é bastante recente e o número de trabalhos relacionando a depressão e o seu tratamento com o sistema glutamatérgico também aumentou recentemente, principalmente, após a descoberta do efeito antidepressivo induzido pela ketamina.

Nesse sentido, considerando as evidências de que a ketamina ativa uma série de complexos eventos intra e extracelulares no tecido neuronal e culmina, por exemplo, com alterações na expressão de genes importantes para neuroplasticidade, é plausível sugerir que mecanismos epigenéticos poderiam estar associados ao seu efeito comportamental e às alterações que essa droga promove em diversas estruturas encefálicas.

Corroborando essa hipótese, evidências têm demonstrado que os efeitos induzidos pela ketamina parecem decorrer, ao menos em partes, da regulação da expressão gênica por microRNAs. Essa droga, bem como a fluoxetina e a eletroconvulsoterapia (ECT), foi capaz de reverter alguns dos efeitos que o estresse de separação materna em ratos promoveu sobre a expressão de diversos miRNAs no hipocampo desses animais (O'Connor *et al.*, 2013), além de reduzir os níveis hipocampais de miR-206, o qual modula a expressão do gene do BDNF (Yang *et al.*, 2014), sugerindo que as alterações plásticas observadas após tratamento com ketamina, importantes para o seu efeito, poderiam decorrer da regulação da expressão de genes como o do BDNF por meio de microRNAs.

Somado a isso, no núcleo accumbens de ratos privados de cuidado materno, administração de ketamina, bem como de imipramina, diminui atividade de HDAC, indicando que o mecanismo de acetilação de histonas poderia estar envolvido na reversão dos efeitos induzidos pelo estresse (Réus *et al.*, 2013). Sustentando essa

hipótese, tem-se que a ketamina estimula a fosforilação e exportação nuclear de HDAC5, enquanto a inibição genética dessa deacetilase no hipocampo bloqueia o efeito o tipo-antidepressivo dessa droga (Choi *et al.*, 2015).

Considerando o exposto, estudos indicam que os efeitos comportamentais e moleculares induzidos pela ketamina podem estar associados, ao menos parcialmente, com alterações epigenéticas como as modificações pós-traducionais da cauda N-terminal de histonas (por exemplo acetilação) e mecanismos não-transcricionais de silenciamento gênico (como os microRNAs). No entanto, até o momento, não existem evidências demonstrando os efeitos da ketamina sobre a metilação do DNA.

Dadas as evidências que indicam alterações no padrão de metilação do DNA no cérebro de indivíduos deprimidos (Krishnan e Nestler, 2010) e aumento da expressão de DNMTs acompanhado por aumento da metilação do DNA em estruturas cerebrais de animais expostos a diferentes estressores (LaPlant *et al.*, 2010; Miller e Sweatt, 2007), sabe-se que esse mecanismo epigenético possui um importante papel na neurobiologia da depressão. Somando isso ao fato de que inibidores de DNMTs induzem efeito tipo-antidepressivo em modelos animais, acompanhado de um aumento de BDNF no hipocampo (Sales *et al.*, 2011), tem-se que esse mecanismo epigenético também pode ser alvo de modulação e estudo no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Por fim, relacionando esses encontros com as evidências apresentadas sobre o efeito antidepressivo da ketamina, cujo mecanismo parece envolver complexas cascatas de sinalização subsequentes à inibição do receptor NMDA, que culminam com a modulação da expressão gênica e síntese de proteínas (como o BDNF), alterações decorrentes do tratamento com ketamina e a modulação da metilação do DNA em estruturas cerebrais parecem ter muito em comum. Dessa forma, o estudo de uma possível associação entre essas duas vertentes torna-se bastante interesssante.

Abrangendo áreas de análise que vêm apresentando atualmente contribuições significativas e promissoras para o campo da neuropsicofarmacologia, o conjunto de dados obtidos com esse estudo pode contribuir para o melhor conhecimento do mecanismo de ação da ketamina e a influência da neurotransmissão glutamatérgica e dos mecanismos epigenéticos sobre o desenvolvimento de novos e melhores antidepressivos.

1.5. Hipótese

Diante do exposto, a hipótese do presente estudo é de que alterações na metilação global do DNA e/ou nos níveis de DNMTs em estruturas límbicas estão associadas aos efeitos do tratamento com antagonistas do receptor NMDA, ketamina e MK-801, em doses e protocolos de administração que induzem um efeito tipo-antidepressivo em animais submetidos ao FST.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos da administração de antagonistas do receptor NMDA, ketamina e MK-801, em doses e protocolos de tratamento que promovam um efeito tipo-antidepressivo no FST, sobre a metilação do DNA no córtex frontal (CF), hipocampo ventral (HV) e hipocampo dorsal (HD) de animais submetidos ou não ao estresse desse modelo.

Objetivos Específicos:

a) **Capítulo 1:** Delinear protocolos experimentais adequados para análise do efeito tipo-antidepressivo induzido por antagonistas do receptor NMDA em animais submetidos ao FST.

- Realizar revisão crítica dos dados descritos na literatura sobre os efeitos da ketamina no FST, analisando a reprodutibilidade dos resultados quando considerados os diferentes protocolos experimentais empregados;
- Delinear e testar um protocolo experimental para análise do efeito tipo-antidepressivo rápido induzido pela administração de ketamina e MK-801 em animais submetidos ao FST.
- Delinear e testar um protocolo experimental para análise do efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pela administração de ketamina e MK-801 em animais submetidos ao FST até 7 dias após o tratamento.

b) **Capítulo 2:** Avaliar os efeitos do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação do DNA em estruturas encefálicas relacionadas ao controle da resposta emocional.

- Quantificar os níveis de metilação global do DNA no CF, HV e HD de animais, submetidos ou não ao estresse do pré-teste do FST, após tratamento com os antagonistas do receptor NMDA: efeito rápido e sustentado.
- Quantificar a expressão de DNMT3a e DNMT3b no CF, HV e HD de animais, submetidos ou não ao estresse do pré-teste do FST, após tratamento com os antagonistas do receptor NMDA: efeito rápido e sustentado.

Capítulo 1

Experimentos Comportamentais

Delineamento de protocolos experimentais para análise do efeito tipo-antidepressivo induzido por antagonistas do receptor NMDA no Teste do Nado Forçado.

3. CAPÍTULO 1

3.1. Contexto

O efeito de antagonistas do receptor NMDA em animais submetidos ao FST: efeitos da ketamina.

Conforme citado na introdução deste estudo, o FST é um teste animal amplamente utilizado na investigação do potencial antidepressivo de drogas, pelo fato de ser sensível às principais classes, como os antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e inibidores da MAO (Porsolt *et al.*, 1977). Neste modelo, baseado no comportamento de ratos ou camundongos, é simulada uma situação inescapável de estresse, em que os animais são submetidos à natação forçada em um cilindro de plástico contendo água até um nível em que eles não conseguem se apoiar no fundo nem tampouco sair do cilindro. Assim, executam inicialmente movimentos vigorosos na tentativa de escapar e, em seguida, realizam apenas os movimentos necessários para mantê-los com a cabeça acima da água, adotando uma postura de imobilidade (Porsolt *et al.*, 1977). O tratamento agudo ou subcrônico com antidepressivos de diferentes classes reduz o tempo de imobilidade dos animais (Porsolt *et al.*, 1978), demonstrando uma alta validade preditiva para o teste.

O protocolo original do FST com ratos envolve 2 sessões de exposição dos animais ao nado: a sessão pré-teste de 15 minutos seguida, 24 horas depois, pela sessão teste de 5 minutos. Na sessão pré-teste, os ratos apresentam um comportamento de exploração, nadando na superfície da água e também mergulhando, enquanto na sessão teste, quando já estão familiarizados com o ambiente, apresentam um comportamento reduzido ou ausente de mergulho (Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Assim, o pré-teste é um estressor conhecido por induzir um estado de “desespero comportamental” (Porsolt *et al.*, 1978) ou uma estratégia passiva de enfrentamento deste (West, 1990), já que torna os animais mais imóveis na sessão teste. Entre estas duas sessões, rotineiramente, é feita a administração das drogas alvo do estudo (como os antidepressivos), sendo que o delineamento padrão consiste em 3 doses de tratamento 23, 5 e 1 hora antes da sessão teste,

proposto para mimetizar um protocolo de administração subcrônico das drogas (Porsolt *et al.*, 1977). Ainda, para evitar a influência do tratamento sobre a sessão pré-teste, não é recomendado conduzir as administrações antes desta, de tal forma que mesmo que o delineamento do estudo refira-se a um regime de tratamento crônico, este também pode ser realizado entre a sessão pré-teste e a teste (Porsolt et al., 2001), com mais de 24 horas de intervalo entre elas. De fato, Borsini e Meli (1988) reportaram que um intervalo de até 7 semanas entre as sessões do FST não influenciou a resposta de imobilidade ao veículo ou tratamento antidepressivo.

Os camundongos, por outro lado, não apresentam o comportamento de exploração com mergulho quando submetidos ao nado forçado e, portanto, não são necessárias 2 exposições destes animais ao nado para investigação do potencial antidepressivo de drogas. Isso simplifica o teste e, ainda, elimina a possibilidade de que o processo de memória influencie sobre o comportamento dos animais, um fator que é usualmente relacionado à imobilidade apresentada por ratos na sessão teste do FST (Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Dessa forma, o protocolo original do FST com camundongos consiste em submetê-los ao nado por 6 minutos, sendo que depois de 2 minutos já adotam a postura típica de imobilidade e, assim, a resposta aos fármacos é quantificada nos últimos 4 minutos. Neste protocolo, uma única administração sistêmica de antidepressivos 1 hora ou 30 minutos antes do teste induz uma redução no tempo de imobilidade dos animais (Porsolt *et al.*, 1977).

No entanto, desde a primeira descrição do FST com ratos ou camundongos, modificações na metodologia original têm sido propostas e utilizadas para acessar os efeitos de uma diversidade de substâncias, variando-se, por exemplo, o diâmetro do cilindro utilizado, profundidade e temperatura da água, protocolo de administração e intervalo entre tratamento e teste ou método de quantificação do tempo de imobilidade (Bogdanova *et al.*, 2013; Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Tais alterações experimentais, por sua vez, podem ser a causa das diferenças encontradas para a linha de base do tempo de imobilidade de animais controle. Ademais, podem haver, ainda, modificações relacionadas especificamente aos animais, como linhagens utilizadas, condições de alojamento, gênero e idade. Em conjunto, todas essas condições podem alterar o tempo de imobilidade dos animais e, consequentemente, afetar a avaliação dos efeitos antidepressivos de fármacos,

gerando uma variabilidade entre os dados e resultados obtidos nos diferentes estudos (Bogdanova *et al.*, 2013; Petit-Demouliere *et al.*, 2005).

Nesse contexto, merecem destaque para o presente estudo os diversos trabalhos que têm avaliado os efeitos induzidos pela administração de drogas que interferem na neurotransmissão glutamatérgica sob o comportamento de animais submetidos ao FST. Desde que, em 1990, Trullas e Skolnick demonstraram que a administração de MK-801 e AP-7, ambos antagonistas do receptor NMDA, eram capazes de induzir efeitos tipo-antidepressivo neste teste com camundongos, crescentes evidências reiteram a importância do sistema glutamatérgico para a neurobiologia da depressão e o seu tratamento, em estudos clínicos e pré-clínicos. Porém, foram as recentes descobertas sobre a ação antidepressiva da ketamina que realmente incentivaram os diversos trabalhos que vêm investigando o potencial de diferentes drogas que atuam sobre o sistema glutamatérgico para o tratamento da depressão (Duman e Aghajanian, 2014; Kugaya e Sanacora, 2005; Mathews *et al.*, 2012; Sanacora *et al.*, 2012) e, nesse sentido, o FST destaca-se como uma das ferrramentas mais utilizadas nos estudos pré-clínicos devido á sua preditibilidade farmacológica.

No entanto, focando-se na ketamina, tem-se que, principalmente pelo fato desta induzir um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado, diversas modificações na metodologia original do FST têm sido utilizadas para análise dos efeitos comportamentais induzidos por essa droga em ratos e camundongos. Resumidamente, são encontradas variações, por exemplo, no intervalo decorrido entre tratamento e teste, número de administrações da droga e exposições de um mesmo animal ao FST ou o tempo máximo após tratamento que os animais ainda apresentam redução do tempo de imobilidade, o que se torna ainda mais relevante considerando variações também encontradas nas características do fármaco administrado (preparações químicas, farmacêuticas e doses) e nos animais utilizados (linhagens, idade) para tais testes.

As variações experimentais, por sua vez, podem ser possíveis explicações para o fato de que, embora a grande maioria dos trabalhos da literatura demonstrem um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado induzido pela ketamina em animais submetidos ao FST (Autry *et al.*, 2011; Burgdorf *et al.*, 2013; Maeng *et al.*, 2008; Réus *et al.*, 2011; Tizabi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011), outros trabalhos falharam

em reproduzir tais efeitos (Bechtholt-Gompf *et al.*, 2011; Popik *et al.*, 2008). Além disso, alguns trabalhos não apresentam detalhes suficientes sobre a metodologia utilizada e outras características que poderiam influenciar sobre os diversos parâmetros aqui citados. Sendo assim, no presente estudo e conforme será detalhado neste capítulo, após a condução de uma revisão da literatura considerando os trabalhos que analisaram o efeito tipo-antidepressivo da ketamina no FST, buscou-se reproduzir alguns resultados com a utilização dos mesmos procedimentos experimentais descritos pelos pesquisadores e, ainda, observar as consequências comportamentais induzidas por possíveis variações em tais protocolos, como intervalos entre tratamento e teste, doses ou espécies animais utilizadas, culminando com o delineamento de protocolos experimentais que, efetivamente, permitissem a análise do efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado da ketamina no FST. Adicionou-se, ainda, outro antagonista do receptor NMDA para comparação dos protocolos e efeitos, o MK-801.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 com 7 a 8 semanas e ratos Wistar com 270 a 300 gramas no início dos experimentos, ambos machos, provenientes do Biotério Central da USP de Ribeirão Preto e mantidos em salas separadas do biotério da disciplina de Farmacologia da FCFRP-USP. Para ambientação, todos os animais foram ainda mantidos neste biotério por 1 semana antes de iniciar os experimentos, sempre em condições controladas de temperatura (23° + 1°C) e ciclo de luz (luzes acesas das 6:00 às 18:00 horas), com livre acesso à água e alimento. Os camundongos foram mantidos em uma estante ventilada (Alesco), agrupos (4 animais) em mini-isoladores (32 x 20 x 21 cm) forrados com serragem (trocada 2 vezes por semana), enquanto os ratos foram mantidos aos pares em caixas de polipropileno (30 x 19 x 13 cm) também forradas com serragem (trocada 3 vezes por semana). A manipulação dos animais, tanto para manutenção quanto para condução dos procedimentos experimentais, foi realizada sempre pelo mesmo experimentador no período da manhã (das 7:00 às 13:00 horas).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do campus de Ribeirão Preto – USP (protocolo n° 14.1.152.53.1; ANEXO I) e os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento sobre os cuidados com animais de laboratório, que estão de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) dispostas na lei Arouca (11.794/08).

3.2.2. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Fluoxetina (Sigma): inibidor seletivo da recaptação de serotonina, nas doses de 10, 20 e 30 mg/Kg (Kulkarni e Dhir, 2007);
- S(+)-ketamina (dextrocetamina; Cristália) e (±)-ketamina (mistura racêmica; Dopalen - Ceva): antagonista não-competitivo de receptores de glutamato tipo

NMDA nas doses de 1, 2,5, 5, 10 e 30 mg/Kg (Maeng *et al.*, 2008; Réus *et al.*, 2011);

- MK-801 (Sigma): antagonista não-competitivo do receptor NMDA, nas doses de 0,025, 0,5 e 0,1 mg/Kg (Maeng *et al.*, 2008).

Como veículos, foram utilizados Tween 2% / salina isotônica para a fluoxetina e salina isotônica para a ketamina e o MK-801. As drogas foram dissolvidas imediatamente antes do uso e administradas por via intraperitoneal (ip; 10 ml/Kg em camundongos e 1 ml/Kg em ratos).

3.2.3. Procedimentos experimentais

3.2.3.1. Teste do nado forçado (FST)

O FST foi utilizado no presente trabalho para ratos e camundongos, seguindo uma metodologia amplamente descrita na literatura (Cryan *et al.*, 2002; Petit-Demouliere *et al.*, 2005) e será especificado em detalhes nos itens 3.2.3.1.1 e 3.2.3.1.2. Em ambos os casos, a água do recipiente foi trocada após o teste de cada animal, a fim de manter sua temperatura controlada em 24 ± 1°C, e prevenir a influência de substâncias de alarme (Abel e Bilitzke, 1990). O comportamento dos animais foi registrado com uma câmera de vídeo e, posteriormente, o tempo total de imobilidade exibido foi quantificado de maneira cega, lembrando que o tratamento com antidepressivos de diferentes classes reduz este tempo durante o teste com animais (Porsolt *et al.*, 1978).

3.2.3.1.1. FST em camundongos

Camundongos foram administrados com fluoxetina, ketamina, MK-801 ou veículo em ordem aleatória, por via intraperitoneal (10 ml/kg). Decorridos 30 minutos (análise do efeito rápido), 24 horas ou 7 dias (análise do efeito sustentado) após cada injeção, grupos independentes foram colocados em um cilindro de plástico (25cm de altura e 17cm de diâmetro) preenchido com água até 10cm e foram submetidos à natação forçada durante 6 minutos. O comportamento dos animais foi

registrado e o tempo total de imobilidade exibido durante os últimos 4 minutos do teste foi quantificado.

3.2.3.1.2. FST em ratos

O FST para ratos foi realizado com procedimentos similares aos descritos por Porsolt e colaboradores (1977). Os animais foram colocados para nadar, individualmente, em um cilindro de plástico (30cm de diâmetro, 40cm de altura) contendo 25cm de água com temperatura controlada por um período de 15 minutos (pré-teste). Após esse período, foram retirados e colocados, separadamente, para secar, antes de retornarem para suas caixas de origem. Vinte e três horas depois, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (1ml/Kg) de ketamina, MK-801 ou veículo e foram submetidos a sessões de 5 minutos de nado forçado, 1 hora (análise do efeito rápido) ou até 7 dias após o tratamento (análise do efeito sustentado). Essa segunda sessão de nado forçado, por sua vez, refere-se ao teste, quando foi registrado o tempo total de imobilidade dos animais.

3.2.3.2. Teste do campo aberto (OFT)

Alguns compostos com propriedades psicoestimulantes podem produzir resultados falso-positivos no FST, por aumentarem a atividade locomotora dos animais (Borsini e Meli, 1988; Willner, 1984). Dessa forma, no intuito de excluir a possibilidade de que alguma alteração locomotora induzida pelas drogas estivesse interferindo no FST, os animais receberam os tratamentos farmacológicos relatados anteriormente e foram, posteriormente, submetidos ao OFT.

No presente estudo, o OFT foi utilizado apenas com ratos, o qual consiste em colocar os animais para se locomoverem livremente, individualmente, no centro de uma caixa quadrada de madeira (72cm x 72cm, 40cm de altura), dividida em 16 quadrantes (18cm x 18cm), por um período de 5 minutos. Durante esse período, o teste é filmado e, posteriormente, a distância total percorrida e a distância percorrida por minuto é registrada com o auxílio do software Any-Maze (V. 4.5, Stolelting, IL, USA) e utilizada como índice da atividade motora desses animais.

3.2.4. Desenho Experimental

3.2.4.1. Experimentos conduzidos com camundongos

Experimento 1: Efeito da administração sistêmica de fluoxetina, S(+)-ketamina ou MK-801 sobre o comportamento de camundongos submetidos, 30 minutos depois, ao FST.

Camundongos foram tratados com fluoxetina nas doses de 10, 20 e 30 mg/Kg ou veículo por via i.p. (10 ml/Kg) e submetidos ao FST 30 minutos depois, no intuito de se construir uma curva dose-resposta e determinar a dose de fluoxetina que poderia ser utilizada como controle positivo nos experimentos posteriores (experimento 1A). O mesmo procedimento experimental foi utilizado com grupos independentes para avaliar o efeito da S(+)-Ketamina (1, 2,5 e 5 mg/Kg; experimento 1B) ou do MK-801 (0,05, 0,1 e 0,2 mg/Kg; experimento 1C) no FST. Os animais foram filmados durante o teste para posterior avaliação do tempo de imobilidade, com o objetivo de analisar o efeito tipo-antidepressivo agudo induzido pelo tratamento.

Experimento 2: Efeito da administração sistêmica de fluoxetina ou S(+)-ketamina sobre o comportamento de camundongos submetidos, 7 dias depois, ao FST.

Grupos independentes de camundongos foram tratados com fluoxetina 20 mg/Kg (dose determinada no experimento 1A), S(+)-ketamina (1, 2,5 e 5 mg/Kg) ou veículo por via i.p. (10 ml/Kg) e foram submetidos ao FST 7 dias depois (experimento 2A). Posteriormente, o mesmo procedimento experimental foi utilizado, porém com a adição das doses de 10 e 30 mg/Kg de S(+)-ketamina e tratamento com fluoxetina 30 min antes do teste para servir de controle positivo do teste (experimento 2B). Ambos os experimentos foram filmados para posterior avaliação do tempo de imobilidade, com o objetivo de analisar um possível efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pelo antagonista glutamatérgico em questão.

Experimento 3: Efeito da administração sistêmica de ketamina sobre o comportamento de camundongos submetidos, 24 horas depois, ao FST.

Grupos independentes de camundongos receberam uma injeção i.p. (10 ml/Kg) do isômero dextrógiro da ketamina (S(+)) nas doses de 1, 2,5 e 5 mg/Kg ou veículo e foram submetidos ao FST 24 horas depois (experimento 3A). Grupos distintos de animais foram, ainda, administrados com a forma racêmica da mesma droga ((±)-ketamina) nas doses de 1, 2,5, 5, 10 e 30 mg/Kg ou veículo e submetidos ao FST também 24 horas após o tratamento (experimento 3B). Os animais foram filmados para posterior avaliação do tempo de imobilidade, afim de se analisar o curso temporal de um possível efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pela ketamina.

3.2.4.2. Experimentos conduzidos com ratos

Experimento 4: Efeito da administração sistêmica de ketamina, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de ratos submetidos, 24 horas depois, ao FST.

Os animais foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, imediatamente após, foi administrado, em grupos independentes, (±)-ketamina (10 mg/Kg), S(+)-ketamina (10 mg/Kg) ou veículo por via i.p. (1 ml/Kg). Após 24 horas, os animais foram submetidos ao teste, com duração de 5 minutos e este foi filmado para posterior avaliação do tempo de imobilidade, com o objetivo de analisar um possível efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pelo antagonista glutamatérgico em questão no FST em ratos.

Experimento 5: Efeito da administração sistêmica de ketamina sobre o comportamento de ratos submetidos ao FST 1 hora, 24 horas e 7 dias após o tratamento.

Grupos independentes de ratos foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, 24 horas depois, ao teste do nado forçado. Uma hora antes do início do teste (experimento 5A), foi administrado a cada grupo (±)-ketamina (10 mg/Kg), S(+)-ketamina (10 mg/Kg) ou veículo por via i.p. (1 ml/Kg) e os animais foram filmados

durante o teste para posterior avaliação do efeito tipo-antidepressivo rápido induzido pelo tratamento com ketamina em ratos submetidos ao FST.

Decorridas 24 horas da realização do protocolo experimental acima descrito, os mesmos grupos de animais foram ressubmetidos ao teste (5 min; experimento 5B). Cinco dias após a realização deste (7 dias após o tratamento inicial), um terceiro teste foi conduzido ainda com os mesmos animais (experimento 5C). Os experimentos foram filmados e o tempo de imobilidade dos animais foi posteriormente avaliado, afim de verificar se o efeito tipo-antidepressivo induzido pelo tratamento em ratos submetidos ao primeiro teste permanecia no segundo e terceiro testes, indicando um curso temporal para um possível efeito sustentado da ketamina.

Experimento 6: Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina sobre o comportamento de ratos submetidos, 7 dias depois, ao FST.

Ao se considerar o experimento 5 realizado, tem-se que seu desenho experimental poderia induzir uma habituação dos animais submetidos ao FST, pelo fato destes serem reexpostos ao teste com o decorrer do tempo. Além disso, um grande número de grupos experimentais seriam decorrentes de tal protocolo para posteriores análises moleculares.

Assim, no intuito de evitar a ocorrência desses fatores, o protocolo experimental foi alterado para a condução de apenas 1 teste 7 dias após o tratamento. Dessa forma, grupos independentes de ratos foram submetidos ao pré-teste (15 min) e 23 horas depois receberam uma injeção i.p. (10 ml/Kg) de S(+)-ketamina (10 mg/Kg) ou veículo. Decorridos 7 dias após o tratamento, os animais foram submetidos ao teste do FST (5 min), o qual foi filmado para posterior análise do tempo de imobilidade.

Experimento 7: Efeito da administração sistêmica de MK-801 sobre o comportamento de ratos submetidos, 1 hora depois, ao FST.

Grupos independentes de ratos foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, 24 horas depois, ao teste. Uma hora antes do início do teste, os animais foram administrados com MK-801 (0,025, 0,05 ou 0,1 mg/Kg) ou veículo por via i.p (10 ml/Kg). O experimento foi filmado para posterior avaliação do tempo de imobilidade e

construção da curva dose-resposta referente ao efeito tipo-antidepressivo rápido induzido pelo tratamento com MK-801.

Experimento 8: Efeitos da administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA sobre o comportamento de ratos submetidos, 1 hora depois, ao OFT.

Os animais receberam uma injeção i.p. (10 ml/Kg) de S(+)-ketamina (10 mg/Kg), MK-801 (0,025 e 0,1 mg/Kg) ou veículo, em grupos independentes, 1 hora antes do inicio do OFT, o qual foi conduzido por 5 minutos e registrado por meio de filmagem para posterior análise. A distância total percorrida (experimento 8A) e a distância percorrida por minuto (experimento 8B) foram calculadas com o auxílio do software Any-Maze (V. 4.5, Stolelting, IL, USA) e utilizadas como índice da atividade motora desses animais, afim de se anular possíveis falsos positivos do efeito tipo-antidepressivo rápido encontrado no FST.

Experimento 9: Efeito da administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA sobre o comportamento de ratos submetidos, 7 dias depois, ao FST.

Grupos independentes de ratos foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, 23h depois, foram administrados com S(+)-ketamina (10 mg/Kg; utilizado como controle positivo do teste, considerando resultado obtido no experimento 6), MK-801 (0,025 mg/Kg; dose que não induz efeito hiperlocomotor, considerando resultado obtido no experimento 8) ou veículo por via i.p. (10 ml/Kg). Decorridos 7 dias após o tratamento, o teste foi conduzido e construiu-se uma curva dose-resposta referente a um possível efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pelo tratamento com MK-801.

Experimento 10: Efeitos da administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA sobre o comportamento de ratos submetidos, 7 dias depois, ao OFT.

Os animais receberam uma injeção i.p. (10 ml/Kg) de S(+)-ketamina (10 mg/Kg), MK-801 (0,025 mg/Kg) ou veículo, em grupos independentes, 7 dias antes do inicio do OFT, o qual foi conduzido por 5 minutos e registrado por meio de filmagem para posterior análise. A distância total percorrida (4.2.7. A) e a distância

percorrida por minuto (4.2.7. B) foram calculadas com o auxílio do software Any-Maze (V. 4.5, Stolelting, IL, USA) e utilizadas como índice da atividade motora desses animais, afim de se anular possíveis falsos positivos do efeito tipo-antidepressivo sustentado encontrado no FST.

3.2.5. Análise estatística

Os resultados dos experimentos comportamentais relativos ao FST e ao OFT, foram comparados através da análise estatística por one-way ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett e, em um caso isolado em que comparou-se apenas 2 grupos experimentais, foi utilizada análise por teste T de Student.

Para os resultados do OFT foi realizada, ainda, análise por two-way ANOVA com medidas repetidas (tratamento x tempo), ao avaliar a distância percorrida por minuto. Diferenças com $p<0,05$ foram consideradas significativas em todos os resultados.

3.3. Resultados

3.3.1. Experimentos conduzidos com camundongos

Experimento 1: Efeito da administração sistêmica de fluoxetina, ketamina ou MK-801 sobre o comportamento de camundongos submetidos, 30 minutos depois, ao FST.

Camundongos foram tratados com fluoxetina nas doses de 10, 20 e 30 mg/Kg ou veículo por via i.p. (10 ml/Kg) e submetidos ao FST 30 minutos depois, no intuito de se construir uma curva dose-resposta e determinar a dose de fluoxetina que poderia ser utilizada como controle positivo nos experimentos posteriores. Análise por One-Way ANOVA seguida de Dunnett demonstrou, então, que a dose de 20 mg/Kg reduziu significativamente o tempo de imobilidade no FST quando comparada ao grupo veículo, apresentando um efeito tipo-antidepressivo [$F(3,27)=3,768$, $p<0,05$; Figura 1A].

O mesmo procedimento experimental foi utilizado com grupos independentes de camundongos e a administração de S(+)-Ketamina (1, 2,5 e 5 mg/Kg) ou MK-801 (0,05, 0,1 e 0,2 mg/Kg). Houve uma redução significativa do tempo de imobilidade dos animais tratados com S(+)-ketamina nas doses de 1 e 5 mg/Kg e com MK-801 nas doses de 0,1 e 0,2 mg/Kg, um resultado equivalente ao induzido após administração de fluoxetina em sua dose efetiva [$F(5,42)=4,703$, $p<0,01$; Figura 1B e $F(4,34)=19,32$, $p<0,001$; Figura 1C].

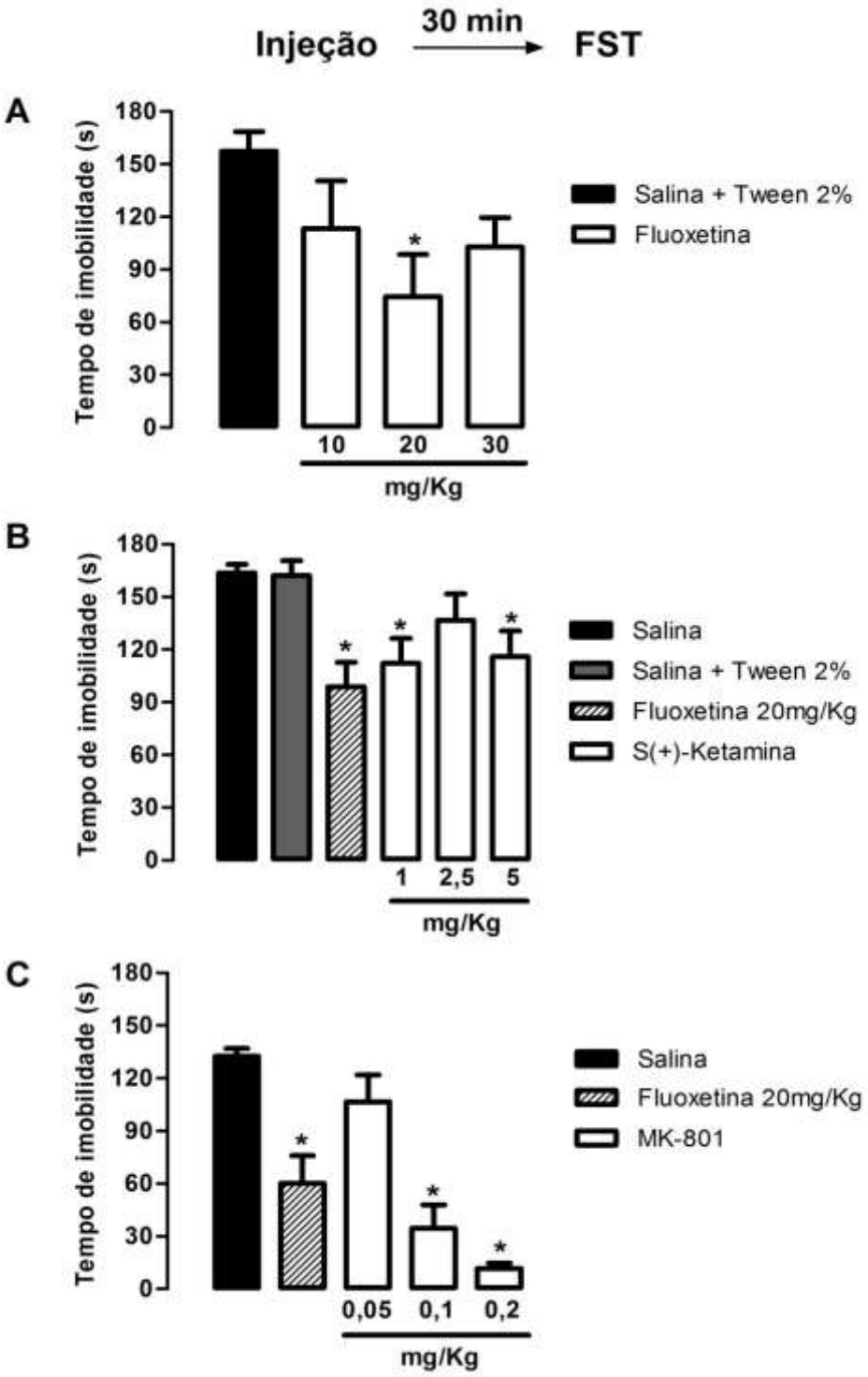

Figura 1. Efeito da administração sistêmica de fluoxetina, S(+)-ketamina ou MK-801 sobre o comportamento de camundongos submetidos, 30 minutos depois, ao FST. Os resultados revelam uma redução do tempo de imobilidade dos animais após tratamento com: **A)** Fluoxetina 20 mg/Kg (n= 7-8/grupo), **B)** S(+)-ketamina 1 e 5 mg/Kg (n=8/grupo), **C)** MK-801 0,1 e 0,2 mg/Kg (n= 7-8/grupo). Dados representam média ± epm. *p<0,05 comparado ao respectivo grupo veículo de cada gráfico: salina + tween 2% ou salina (One-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett).

Experimento 2: Efeito da administração sistêmica de fluoxetina ou S(+)-ketamina sobre o comportamento de camundongos submetidos, 7 dias depois, ao FST.

A administração sistêmica de S(+)-ketamina (1, 2,5 e 5 mg/Kg) em camundongos submetidos 7 dias depois ao FST não resultou em diferença significativa no tempo de imobilidade se comparado ao grupo veículo [$F(4,35)=0,8536$, $p>0,05$; Figura 2A], ou seja, não foi possível observar um efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido por tal tratamento. Esse efeito foi similar ao observado 7 dias após administração de fluoxetina, um antidepressivo clássico que apresenta efeito agudo no FST com camundongos apenas com um curto intervalo de tempo entre a injeção e o teste.

Posteriormente, o mesmo procedimento experimental foi utilizado, porém com a adição das doses de 10 e 30 mg/Kg de S(+)-ketamina e o tratamento com fluoxetina apenas 30 minutos antes do FST, servindo de controle positivo. Tais doses também não foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade se comparadas ao veículo, de modo contrário ao tratamento com fluoxetina [$F(6,35)=7,423$, $p<0,05$; Figura 2B].

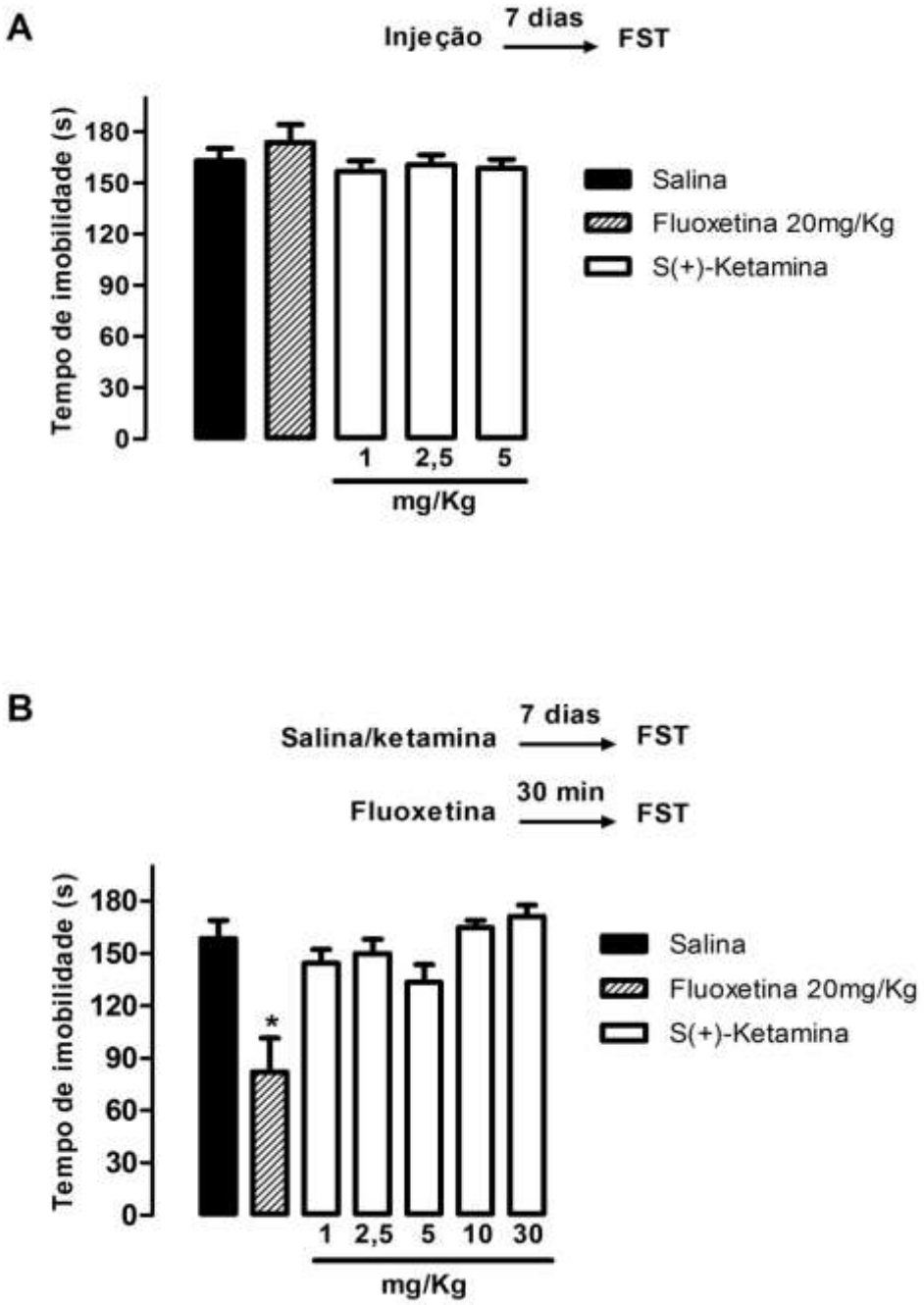

Figura 2. Efeito da administração sistêmica de fluoxetina ou S(+)-ketamina sobre o comportamento de camundongos submetidos, 7 dias depois, ao FST. **A)** Administração de fluoxetina 20 mg/Kg ou S(+)-ketamina 1, 2,5 e 5 mg/Kg não reduz o tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao FST 7 dias depois do tratamento (n=7-9/grupo). **B)** Fluoxetina 20 mg/Kg induz efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao FST 30 minutos após o tratamento, o que não é observado com a administração de S(+)-ketamina em doses baixas (1, 2,5 e 5 mg/Kg) ou altas (10 e 30 mg/Kg) nos animais submetidos ao FST 7 dias depois do tratamento (n=5-8/grupo). Dados representam média ± epm. *$p<0,05$ comparado ao grupo salina (One-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett).

Experimento 3: Efeito comportamental apresentado por camundongos tratados com ketamina e submetidos, 24 horas depois, ao FST.

Na tentativa de analisar o curso temporal de um possível efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pela ketamina, grupos independentes de camundongos receberam uma injeção i.p. (10 ml/Kg) do seu isômero dextrógiro (S(+)) nas doses de 1, 2,5 e 5 mg/Kg ou veículo e foram submetidos ao FST 24 horas depois. Porém, análise por One-Way ANOVA seguida de Dunnett apontou que esse delineamento experimental não resultou em uma diferença significativa do tempo de imobilidade ao comparar os grupos tratados e o grupo veiculo [$F(3,30)=1,421$, $p>0,05$; Figura 3A].

Outros grupos de animais foram administrados com a forma racêmica da mesma droga ((±)-ketamina) nas doses de 1, 2,5, 5, 10 e 30 mg/Kg ou veículo e submetidos ao FST também 24 horas após o tratamento, o que também não induziu quaisquer alterações comportamentais significativas no teste [$F(5,36)=0,999$, $p>0,05$; Figura 3B].

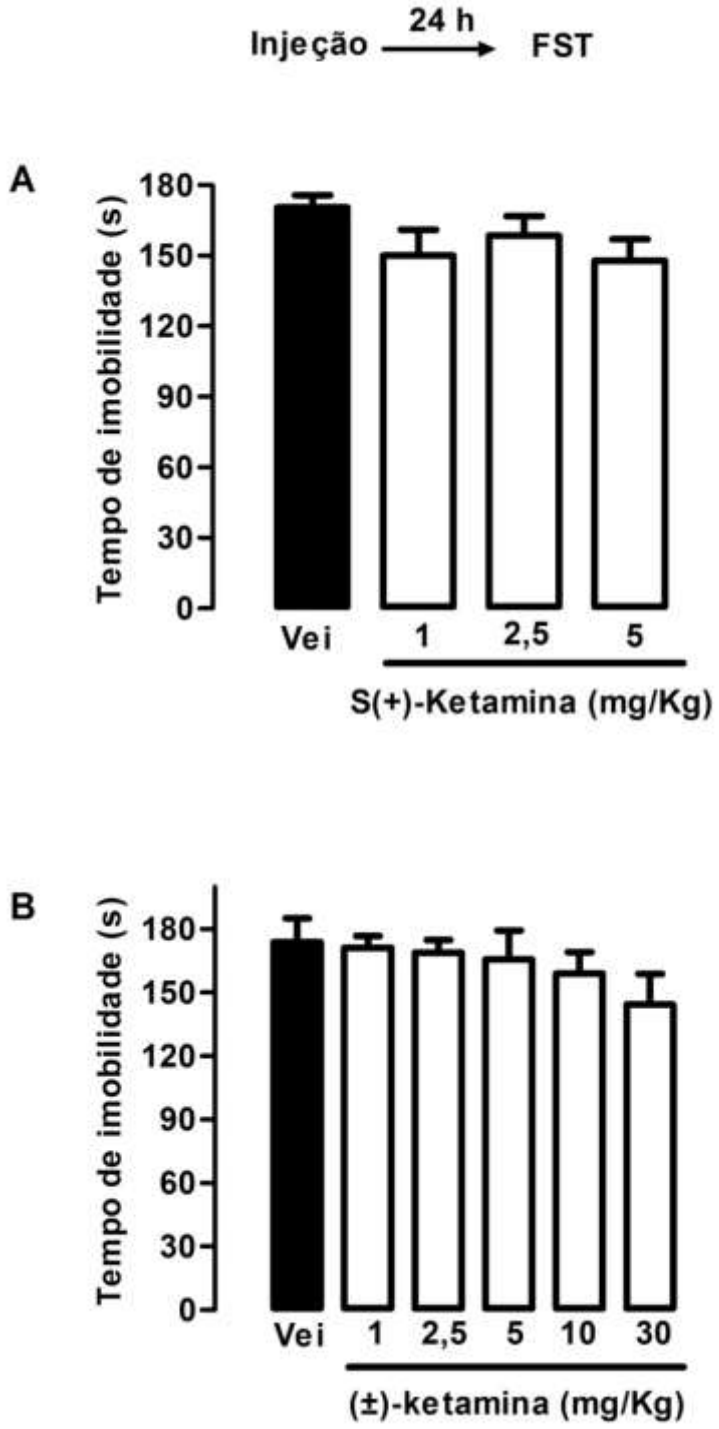

Figura 3. Efeito da administração sistêmica de ketamina sobre o comportamento de camundongos submetidos, 24 depois, ao FST. **A)** S(+)-ketamina 1, 2,5 e 5 mg/Kg não altera o tempo de imobilidade comparado ao grupo veiculo (n=8-9/grupo). **B)** (±)-ketamina 1, 2,5, 5, 10 e 30 mg/Kg não altera o tempo de imobilidade comparado ao grupo veiculo (n=7/grupo). Dados representam média ± epm; vei: veículo. (One-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett, NS).

3.3.2. Experimentos conduzidos com ratos

Experimento 4: Efeito da administração sistêmica de ketamina, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de ratos submetidos, 24 horas depois, ao FST.

Grupos independentes de ratos foram submetidos ao pré-teste (15 min) do FST e, imediatamente depois, receberam uma injeção i.p. (1 ml/Kg) de (±)-ketamina (10 mg/Kg), S(+)-ketamina (10 mg/Kg) ou veículo. Após 24 horas, os animais foram submetidos ao teste, com duração de 5 min e este foi filmado para posterior avaliação do tempo de imobilidade, com o objetivo de analisar um possível efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pelo antagonista glutamatérgico em questão. A análise estatística (One-Way ANOVA seguida de Dunnett) não apontou uma diminuição significativa do tempo de imobilidade dos ratos tratados com quaisquer dos isômeros nesse delineamento experimental, apesar de haver uma aparente tendência gráfica [$F(2,15)=0,360$, $p>0,05$, One-Way ANOVA seguida de Dunnett; Figura 4].

Figura 4. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina ou (±)-ketamina 10 mg/Kg, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de ratos submetidos, 24 horas depois, ao FST (n=6/grupo). Dados representam média ± epm. One-Way ANOVA seguido de Dunnet, NS.

Experimento 5: Efeito da administração sistêmica de ketamina sobre o comportamento de ratos submetidos ao FST 1 hora, 24 horas e 7 dias após o tratamento.

Para análise do efeito tipo-antidepressivo rápido induzido pelo tratamento com ketamina em ratos submetidos ao FST, grupos independentes foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, 24h depois, ao teste, administrando-se 1 hora antes a cada grupo (±)-ketamina (10 mg/Kg), S(+)-ketamina (10 mg/Kg) ou veículo por via i.p. (1 ml/Kg). Administração de S(+)-ketamina induziu uma redução significativa do tempo de imobilidade se comparado ao grupo controle, enquanto a mesma dose de (±)-ketamina apresentou apenas uma aparente tendência à redução [$F(2,37)=9,609$, $p<0,05$; Figura 5 –T1].

Os mesmos grupos de animais foram, então, ressubmetidos ao teste do FST (5 min) 24 horas e 7 dias depois da primeira exposição, afim de verificar se o efeito tipo-antidepressivo induzido pela ketamina no primeiro teste permanecia no segundo e no terceiro, indicando um curso temporal para um possível efeito sustentado dessa droga. Obteve-se com isso uma redução do tempo de imobilidade apenas no último tempo testado nos grupos tratados com S(+)-ketamina ou com (±)-ketamina (10 mg/Kg) [$F(2,37)=1,800$, $p>0,05$; Figura 5-T2 e $F(2,36)=5,186$, $p<0,05$; Figura 5-T3, respectivamente].

Sugere-se, assim, um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado da S(+)-ketamina 10 mg/Kg.

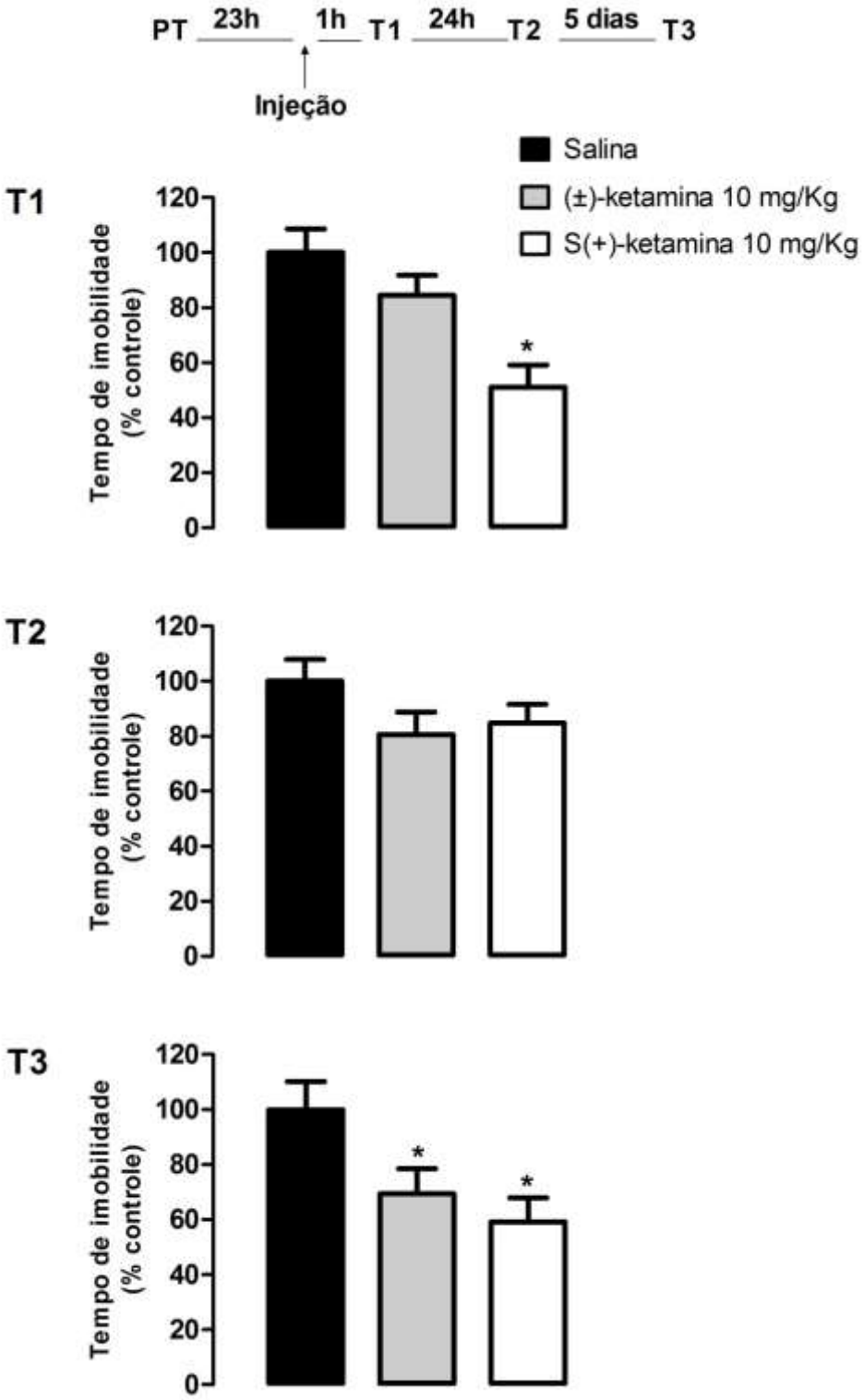

Figura 5. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina ou (±)-ketamina 10 mg/Kg em ratos expostos, após 1 hora, ao FST **(T1)** ou reexpostos 24 horas ou 7 dias depois do tratamento (**T2** e **T3**, respectivamente) (n=12-14/grupo). Dados representam média ± epm. *p<0,05 comparado ao grupo salina (One-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett).

Experimento 6: Efeito da administração sistêmica aguda de S(+)-ketamina sobre o comportamento de ratos submetidos, 7 dias depois, ao FST.

Ao se considerar o experimento 5 realizado, especulamos que o desenho experimental poderia induzir uma habituação dos animais submetidos ao FST, pelo fato destes serem reexpostos ao teste com o decorrer do tempo. Além disso, a partir desse protocolo decorreria um grande número de grupos experimentais (com controle adequados) para posteriores análises moleculares.

Assim, no intuito de evitar a ocorrência desses fatores, o protocolo experimental foi alterado para a condução de apenas 1 teste 7 dias após o tratamento. Dessa forma, grupos independentes de ratos foram submetidos ao pré-teste (15 min) e 23 horas depois receberam uma injeção i.p. (10 ml/Kg) de S(+)-ketamina (10 mg/Kg) ou veículo, sendo submetidos ao teste do FST (5 min) apenas 7 dias após o tratamento. No teste, o grupo tratado com S(+)-ketamina 10 mg/Kg apresentou uma diminuição significativa no tempo de imobilidade [$t(10)=2,363$, $p<0,05$; Figura 6], confirmando o efeito tipo-antidepressivo sustentado dessa droga.

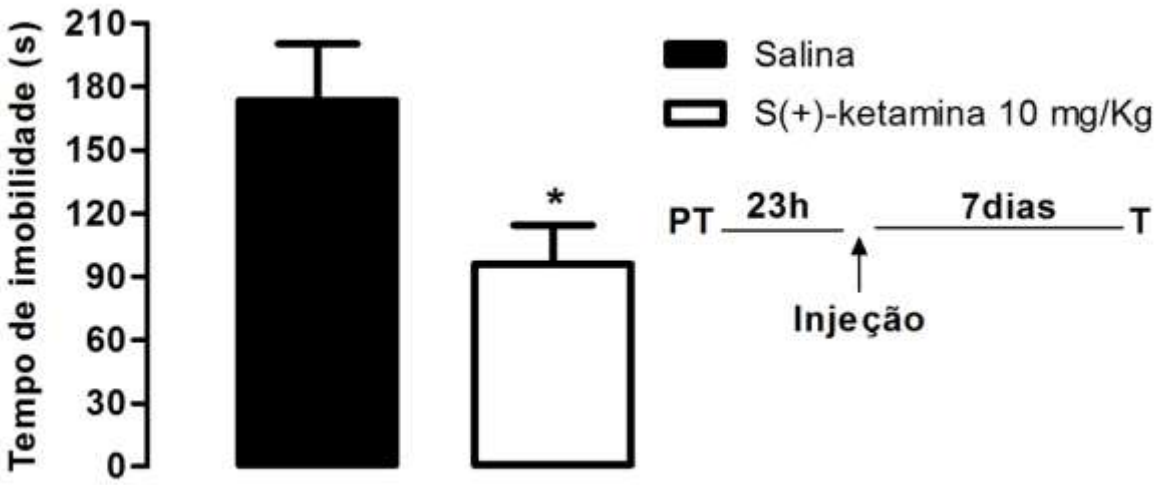

Figura 6. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina sobre o comportamento de ratos submetidos, 7 dias depois, ao FST. Tratamento com esse antagonista do receptor NMDA na dose de 10 mg/Kg reduz o tempo de imobilidade em comparação ao grupo veiculo, induzindo um efeito tipo-antidepressivo sustentado (n=7/grupo). Dados representam média ± epm. *$p<0,05$ (Teste t de Student).

Experimento 7: Efeito da administração sistêmica de MK-801 sobre o comportamento de ratos submetidos, 1 hora depois, ao FST.

Para construção da curva dose-resposta referente ao efeito tipo-antidepressivo rápido induzido pelo tratamento com MK-801, animais foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, 24h depois, ao teste. Uma hora antes do início do teste, foram administrados com MK-801 (0,025, 0,05 ou 0,1 mg/Kg) ou veículo por via i.p (10 ml/Kg).

As doses 0,025 e 0,1 mg/Kg induziram uma redução significativa do tempo de imobilidade se comparado ao grupo controle [$F(3,30)=3,547$, $p<0,05$; Figura 7], sugerindo um efeito tipo-antidepressivo rápido da droga.

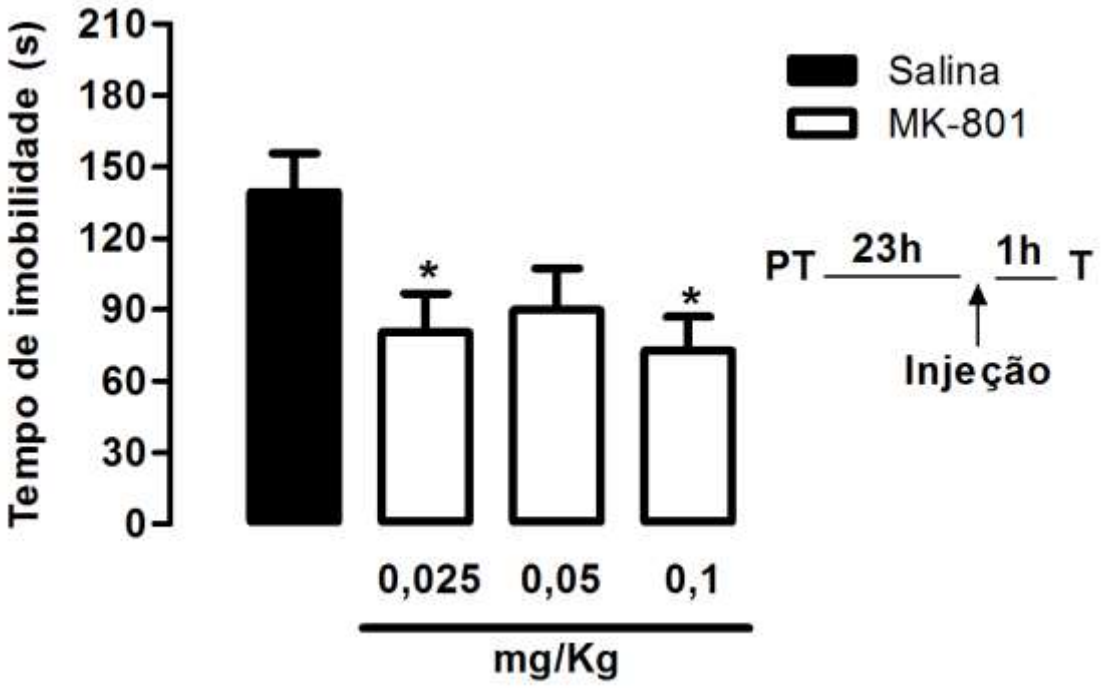

Figura 7. Efeito da administração sistêmica de MK-801 sobre o comportamento de ratos submetidos, 1 depois, ao FST. Tratamento com esse antagonista do receptor NMDA nas doses 0,025 e 0,1 mg/Kg reduz o tempo de imobilidade, induzindo um efeito tipo-antidepressivo rápido (n=8-9/grupo). Dados representam média ± epm. *p<0,05 comparado ao grupo salina (One-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett).

Experimento 8: Efeitos da administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA sobre o comportamento de ratos submetidos, 1 hora depois, ao OFT.

Os animais receberam uma injeção i.p. (10 ml/Kg) de S(+)-ketamina (10 mg/Kg), MK-801 (0,025 e 0,1 mg/Kg) ou veículo, em grupos independentes, 1 hora antes do inicio do OFT, o qual foi conduzido por 5 minutos. Tendo isso, enquanto o tratamento com MK-801 0,025 mg/Kg ou S(+)-ketamina 10 mg/Kg não induziram alteração locomotora nos ratos, o tratamento com MK-801 0,1 mg/Kg aumentou significativamente a distância total percorrida [$F(3,23)=5,375$, $p<0,05$; Figura 8A].

Análise estatística por two-way ANOVA, considerando os fatores tratamento e tempo, apontou efeito do tempo, conforme esperado para esse modelo comportamental [$F(4,115)=25,04$, $p<0,05$], mas também uma diferença significativa do fator tratamento [$F(3,115)=11,08$, $p<0,05$], sem interação entre os fatores [$F(12,115)=0,747$, $p>0,05$]. Pós-teste de Bonferroni indicou um amento da distância total percorrida, nos minutos 4 e 5 do OFT, em ratos que receberam administração sistêmica de MK-801 0,1 mg/Kg.

Assim, sugere-se que a redução do tempo de imobilidade no FST encontrada após tratamento com MK-801 0,1 mg/Kg pode ser decorrente de um falso-positivo devido à hiperlocomoção induzida pela droga, o que não ocorre com os demais tratamentos.

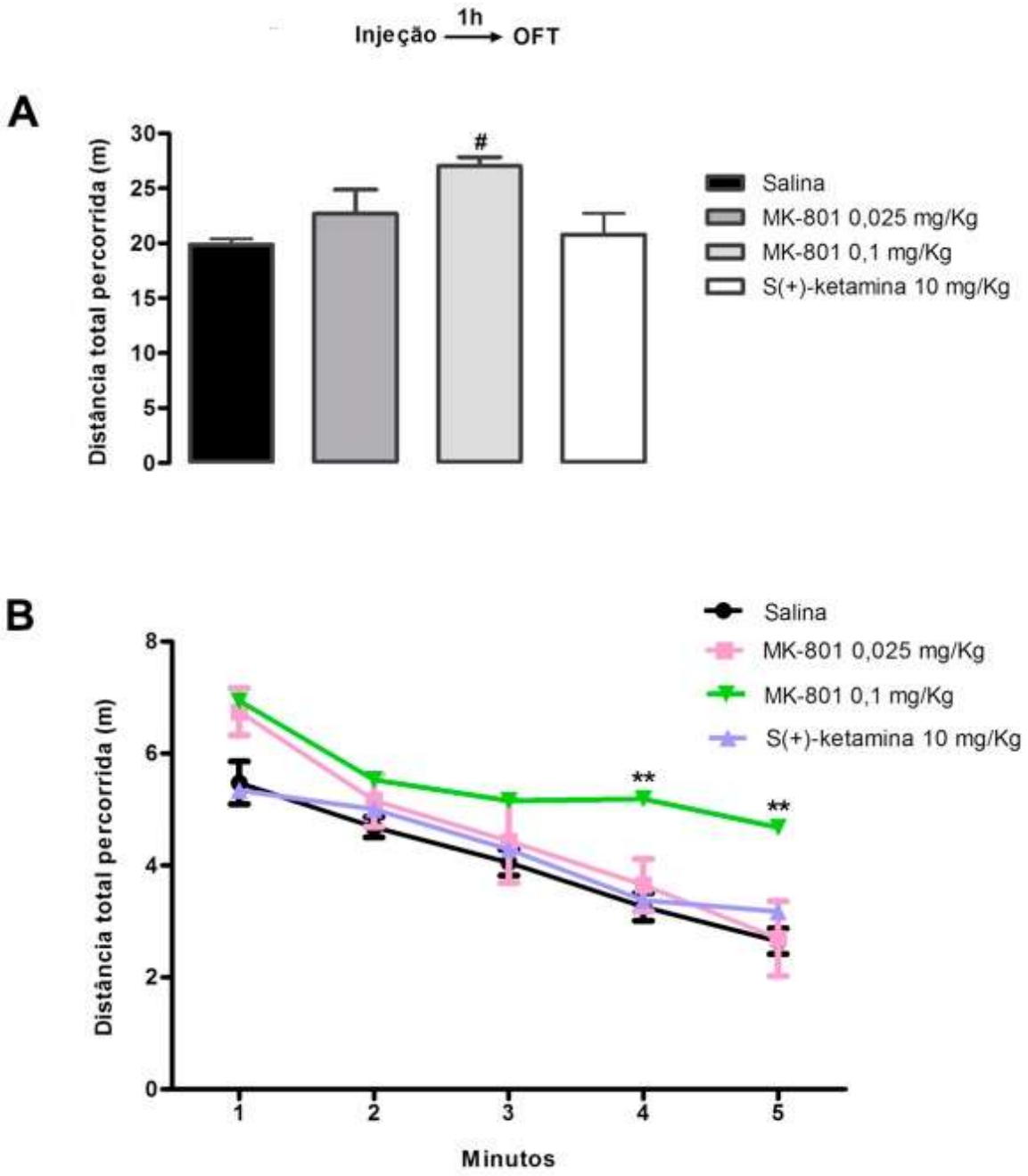

Figura 8. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina (10 mg/Kg) ou MK-801 (0,025 e 0,1 mg/Kg) em ratos expostos, após 1 hora, ao OFT. **A)** Distância total percorrida durante todo o teste (#p<0,05; One-way ANOVA seguida de Dunnett). **B)** Distância total percorrida por minuto do teste (**p<0,05; Two-way ANOVA seguida de Bonferroni). Dados representam média ± epm (n=5-11/grupo).

Experimento 9: Efeito da administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA sobre o comportamento de ratos submetidos, 7 dias depois, ao FST.

Para analisar um possível efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pelo tratamento com MK-801, grupos independentes de ratos foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, 23 horas depois, foram administrados com S(+)-ketamina (10 mg/Kg; utilizado como controle positivo do teste, considerando resultado obtido no experimento 6), MK-801 (0,025 mg/Kg; dose que não induz efeito hiperlocomotor, considerando resultado obtido no experimento 8) ou veículo por via i.p. (10 ml/Kg). Decorridos 7 dias após o tratamento, os animais foram submetidos ao teste (5min).

Tem-se, assim, que administração sistêmica aguda de MK-801 0,025 mg/Kg não alterou o tempo de imobilidade dos ratos de modo contrário à administração de S(+)-ketamina 10 mg/Kg, utilizada como controle positivo do teste. Análise One-Way ANOVA demonstra apenas uma tendência do efeito da S(+)-ketamina, se comparada ao veículo, porém o pós-teste de Dunnett aponta uma diferença significativa entre os grupos [$F(2,13)=3,180$, $p=0,07$; Fig 9]. Isso foi confirmado pelo Teste t de Student realizado entre cada grupo tratado e o grupo salina, demonstrando uma diminuição significativa do tempo de imobilidade após tratamento com a S(+)-ketamina [$t(9)=2,946$, $p<0,05$], mas não com o MK-801 [$t(9)=1,167$, $p>0,05$].

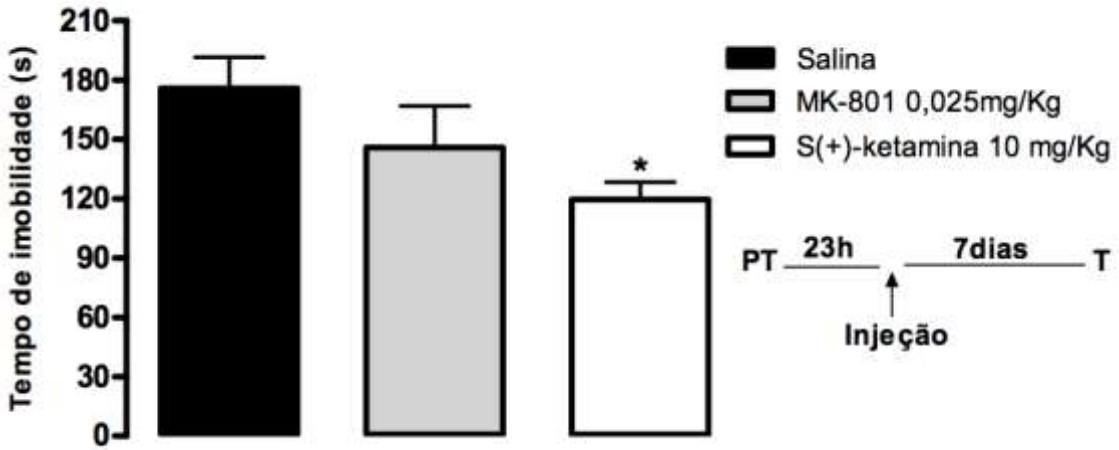

Figura 9. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg em ratos expostos, após 7 dias, ao FST (n=5-6/grupo). Dados representam média ± EPM. *p<0,05 (One-way ANOVA seguida de pós-teste de Dunnett).

Experimento 10: Efeitos da administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA sobre o comportamento de ratos submetidos, 7 dias depois, ao OFT.

Os animais receberam, em grupos independentes, uma injeção i.p. (10 ml/Kg) de S(+)-ketamina (10 mg/Kg), MK-801 (0,025 mg/Kg) ou veículo e, 7 dias depois, foram submetidos ao OFT, o qual foi conduzido por 5 minutos.

O tratamento não induziu alteração locomotora [$F(2,13)=0,328$, $p>0,05$; Figura 10A]. Análise estatística por two-way ANOVA, considerando os fatores tratamento e tempo, também não aponta diferença significativa no tratamento [$F(2,75)=0,639$, $p>0,05$] e nem mesmo interação entre os fatores [$F(8,75)=0,1827$, $p>0,05$]. Assim, anulam-se possíveis falsos positivos do efeito tipo-antidepressivo sustentado encontrado no FST.

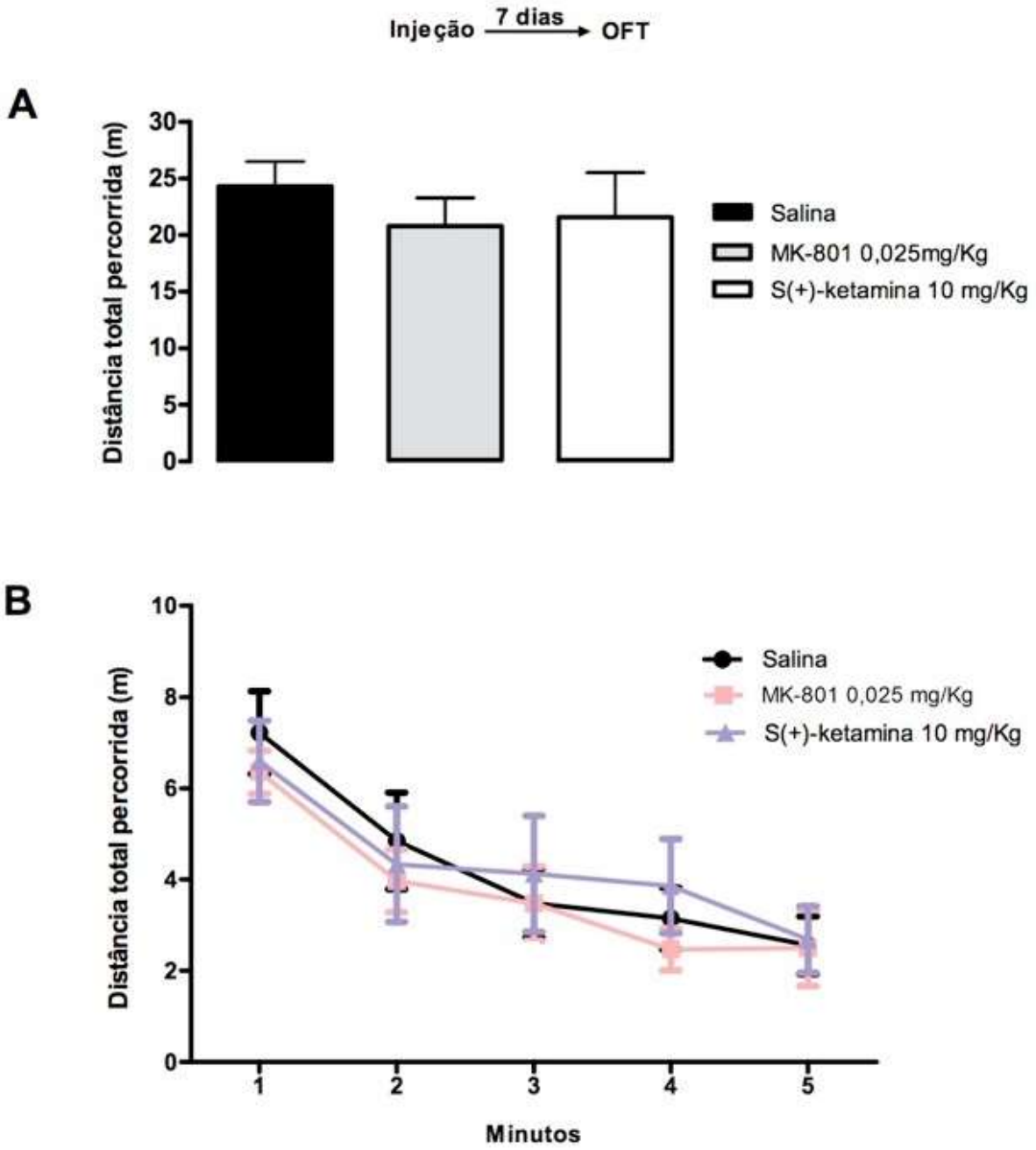

Figura 10. Efeito da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg em ratos expostos, após 7 dias, ao OFT. **A)** Distância total percorrida durante todo o teste. **B)** Distância total percorrida por minuto do teste. Dados representam média ± epm (n= 5-6/grupo).

3.4. Discussão

Os experimentos iniciais aqui apresentados (1 a 3) foram conduzidos com camundongos machos da linhagem C57Bl/6 de 6-8 semanas. A escolha dessa espécie foi assim determinada devido à existência de diversos trabalhos publicados na literatura demonstrando que tais animais apresentam um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado no FST quando tratados com ketamina, antagonista do receptor NMDA.

Maeng e colaboradores (2008) demonstraram que camundongos tratados com ketamina na dose de 2,5 mg/Kg apresentaram uma redução do tempo de imobilidade, se comparados ao grupo veículo, ao serem submetidos ao FST 30 minutos após o tratamento ou, ainda, ressubmetidos ao teste após 2 semanas, demonstrando um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado da droga nessa dose. O mesmo trabalho demonstrou um efeito tipo-antidepressivo rápido de outro antagonista do receptor NMDA, o MK-801, nas doses de 0,05, 0,1 e 0,2 mg/Kg, o que não foi reproduzido após 1 semana, demonstrando que essa droga difere da ketamina por não apresentar um efeito tipo-antidepressivo sustentado.

Com poucas modificações no protocolo experimental, diversos outros trabalhos obtiveram os mesmos resultados se comparados ao acima descrito. Autry e colaboradores (2011), por exemplo, utilizaram grupos independentes de camundongos para cada tempo de exposição ao FST, ao invés de reexpor os mesmos animais como foi feito no trabalho do Maeng (Maeng *et al.*, 2008), demonstrando que a ketamina induziu um menor tempo de imobilidade se comparada ao controle 30 minutos, 3 horas, 24 horas e 1 semana após o tratamento, enquanto a administração de MK-801 apresentou efeito apenas até 3 horas após a administração.

No presente estudo, em camundongos, foi confirmado o efeito tipo-antidepressivo rápido induzido no FST após tratamento com ketamina ou MK-801 (30 min). No entanto, não foi possível reproduzir o efeito sustentado nos animais que receberam uma única administração sistêmica de ketamina e foram submetidos ao FST 24 horas ou 7 dias depois, mesmo utilizando as mesmas doses da droga e os mesmos protocolos experimentais conduzidos nos trabalhos aqui anteriormente citados. Vale constar que a escolha específica em tentar reproduzir os resultados de

trabalhos que utilizaram a linhagem C57Bl/6 de camundongos ocorreu ao considerar que outros estudos falharam em reproduzir o efeito tipo-antidepressivo prolongado da ketamina no FST com outras linhagens, como Swiss e Balb/cJ (Bechtholt-Gompf *et al.*, 2011; Popik *et al.*, 2008).

Somado às diferentes espécies e linhagens animais utilizadas, outro fator de grande inconsistência nos trabalhos disponíveis na literatura é a dose de ketamina utilizada para o estudo do seu efeito antidepressivo. A maioria dos autores utilizou, com camundongos, doses sub-anestésicas de 0,5 a 3 mg/Kg (Autry *et al.*, 2011; Bechtholt-Gompf *et al.*, 2011; Maeng *et al.*, 2008), enquanto outros utilizaram doses maiores, de 10 a 50 mg/Kg (Koike *et al.*, 2011; Lindholm *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013). Tendo isso, e considerando a falta de reprodutibilidade do efeito tipo-antidepressivo sustentado dessa droga nas doses inicialmente testadas, doses maiores como 10 e 30 mg/Kg foram adicionadas ao nosso protocolo experimental. No entanto, se comparados ao controle, essas doses de ketamina também não foram capazes de diminuir o tempo de imobilidade 24 horas ou 7 dias após o tratamento dos animais submetidos ao FST. Tem-se, assim, que mesmo com a variação de diversos parâmetros que poderiam influenciar sobre a resposta analisada, não foi possível reproduzir os resultados de diversos trabalhos da literatura que demostram o efeito sustentado da ketamina em camundongos.

Nesse contexto, é importante considerar que alguns pesquisadores têm recentemente referenciado uma possível “crise” na reprodutibilidade de dados (Begley e Ioannidis, 2015), possivelmente decorrente das deficiências e falhas do sistema tradicional de publicações e revisões (Teixeira da Silva e Dobránszki, 2015) e também à falta de uma cultura generalizada e aceitação da necessidade e importância dos denominados “resultados negativos” (Teixeira da Silva, 2015), os quais muitas vezes não são publicados. Somando isso ao fato de que são encontrados na literatura alguns trabalhos que também falharam em reproduzir o efeito tipo-antidepressivo sustentado da ketamina em camundongos submetidos ao FST (sem considerar a linhagem animal ou a dose de ketamina utilizadas) (Popik et al., 2008; Bechtholt-Gompf et al., 2011; Lindholm et al., 2012), não é possível afirmar que este dado é uma verdade absoluta e reflete a maioria dos resultados obtidos pelos pesquisadores em nível mundial, de tal forma que torna-se plausível a hipótese, já referenciada por Bechtholt-Gompf e colaboradores (2011), de que o FST

com camundongos pode não ser sensível ao efeito tipo-antidepressivo sustentado da ketamina que é relatado em pacientes com depressão.

Então, os experimentos seguintes (4 a 10) foram realizados com ratos da linhagem Wistar, na tentativa de reproduzir os resultados da literatura que demonstram o efeito tipo-antidepressivo da ketamina com essa espécie animal no FST. No entanto, salienta-se uma grande variabilidade entre os dados encontrados na revisão realizada para tal espécie, bem como ocorreu com os camundongos.

Estudos revelam diferenças significativas na sensibilidade de resposta à ketamina entre as diferentes linhagens de ratos. Ratos Wistar, por exemplo, são insensíveis ao efeito tipo-antidepressivo de baixas doses de ketamina (2,5 e 5 mg/Kg) após tratamento crônico, enquanto ratos WKY são extremamente sensíveis à redução no tempo de imobilidade induzida por essa droga no FST (Tizabi *et al.*, 2012).

No presente estudo, administração sistêmica aguda de ketamina na dose de 10 mg/Kg, 1 hora antes da sessão teste do FST, promoveu uma diminuição significativa do tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle. Esse dado demonstra um efeito tipo-antidepressivo rápido induzido pelo tratamento na linhagem animal e procedimento experimental utilizados, o que está de acordo com diversos dados da literatura demonstrando o mesmo efeito (Burgdorf *et al.*, 2013; Réus *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

No FST conduzido em ratos, o tempo de imobilidade é responsivo ao tratamento sistêmico com antidepressivos clássicos, como os monoaminérgicos, apenas depois da administração repetida da droga em um período de 24 horas de intervalo (decorrente entre a sessão de pré-teste e teste) (Cryan *et al.*, 2002; Porsolt *et al.*, 1978). A ketamina, por outro lado, é capaz de reduzir o tempo de imobilidade com uma única administração, por apresentar um perfil farmacológico diferenciado e com ação antidepressiva rápida.

No entanto, enquanto entre os trabalhos da literatura parece existir um acordo em realizar a administração sistêmica da ketamina 1 hora antes do teste para análise da indução do efeito tipo-antidepressivo rápido (resultado aqui reproduzido), o mesmo não ocorre com o efeito sustentado, ou seja, o momento de administração da droga e os procedimentos experimentais utilizados são muito variáveis.

No presente estudo, primeiramente testou-se um protocolo com a administração sistêmica de ketamina (10 mg/Kg) imediatamente após o pré-teste e realização do teste 24 horas depois (mesmo momento em que o animal é submetido para análise do efeito rápido) e, com isso, o tratamento não induziu uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais, apresentando apenas uma tendência para o efeito, de modo contrário ao estudo de Gigliucci e colaboradores (2013)Gigliucci e colaboradores, que demonstrou o efeito tipo-antidepressivo sustentado da ketamina utilizando o mesmo protocolo. No entanto, em tal estudo foram utilizados ratos da linhagem Sprague-Dawley ao invés de Wistar e o efeito tipo-antidepressivo foi observado no FST após administração da ketamina na dose de 25 mg/Kg ao invés de 10 mg/Kg. A dose de 10 mg/Kg, por sua vez, foi utilizada no presente estudo em acordo a outros trabalhos que reportaram a atividade antidepressiva da ketamina nesta dose em ratos (Burgdorf *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

Especialmente para esse protocolo utilizado, cabe ressaltar, ainda, o fato de que muitos pesquisadores propõem que o comportamento de imobilidade aumentada apresentado pelos animais submetidos ao teste pode ser interpretado como uma resposta adaptativa promovida pela aquisição e/ou consolidação da memória adquirida após exposição ao pré-teste (De Pablo *et al.*, 1989; Su *et al.*, 2013; West, 1990). Dessa forma, a administração de antidepressivos após o pré-teste poderia interferir com a consolidação dessa resposta de imobilidade adquirida e avaliada, 24 horas depois, com a exposição dos ratos ao teste (De Pablo *et al.*, 1989). Corroborando isso, trabalhos mostram que a administração de anisomicina, inibidor da síntese de proteínas, antes do pré-teste, também promove uma redução do tempo de imobilidade de ratos no teste (De Pablo *et al.*, 1989). Ademais, estudos mostram que a administração de MK-801 pode interromper o processo de aprendizagem e memória em animais (Harrod *et al.*, 2001), assim como a administração de ketamina em doses anestésicas também interrompeu a consolidação da memória (Moosavi *et al.*, 2012). Então, em conjunto, as evidências apresentadas sugerem que os resultados comportamentais observados com a administração de ketamina após o pré-teste e realização do teste 24 horas depois poderia decorrer de fato de uma ação dessa droga sobre o processo de consolidação da memória.

Dado o exposto, no intuito de evitar a interferência do tratamento sobre os processos de aprendizagem e memória que são comumente relacionados à interpretação da resposta de imobilidade em animais submetidos ao FST, um novo delineamento experimental foi proposto. Neste, o mesmo grupo de animais foram expostos ao FST 1 hora, 24 horas e 7 dias após a administração de ketamina, a qual foi realizada 23 horas após o pré-teste. Interessantemente, houve uma diminuição significativa do tempo de imobilidade apenas 1 hora ou 7 dias após o tratamento, se comparado ao grupo controle. Liu e colaborares (2013) utilizaram um procedimento muito similar a este, com a administração no mesmo momento, porém sem submeter os animais ao primeiro teste (1 hora após o tratamento), ou seja, eram submetidos ao nado forçado apenas 24 horas ou 1 semana (grupos independentes) após o tratamento sistêmico com ketamina e, com isso, observaram um efeito tipo-antidepressivo induzido pela dose de 10 mg/Kg nos dois tempos analisados. Esse dado sugere, então, que no protocolo testado no presente trabalho, o curto intervalo de tempo decorrido entre a primeira exposição ao FST (1 hora após o tratamento; T1) e a segunda (24 horas; T2) poderia estar levando a uma habituação dos animais ao teste, com possível perda da sensibilidade ao efeito antidepressivo da droga.

No intuito de evitar essa habituação dos animais, uma possível proposta seria, então, simplesmente retirar a exposição dos animais ao FST 1 hora após o tratamento e seguir com as demais, o que provavelmente permitia avaliar o efeito sustentado da droga em 24 horas e 7 dias. No entanto, além de avaliar a reprodutibilidade dos dados da literatura e os possíveis parâmetros que podem influenciar sobre os resultados obtidos, no presente estudo, posteriormente, seriam realizadas medidas moleculares com a utilização dos mesmos protocolos experimentais delineados para análise do efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado dos antagonistas do receptor NMDA. Sendo assim, quanto menor o número de variáveis presentes no protocolo utilizado para análise do efeito comportamental, menor seria o número de grupos necessários para a condução dos experimentos posteriores.

Com isso, optou-se por tentar reproduzir os resultados obtidos por Liu e colaboradores (2013) para análise do efeito da droga 7 dias após tratamento. No protocolo utilizado, então, os animais foram submetidos ao pré-teste e 23 horas depois receberam uma injeção de ketamina ou veículo, sendo submetidos ao teste

apenas 7 dias depois e observou-se, assim, uma diminuição significativa do tempo de imobilidade induzido pela droga, ou seja, um efeito tipo-antidepressivo sustentado. O mesmo efeito não foi apresentado após tratamento com outro antagonista do receptor NMDA, MK-801, na dose de 0,025 mg/Kg, corroborando dados da literatura que também não demonstraram efeito sustentado de tal droga (em camundongos) (Autry *et al.*, 2011; Maeng *et al.*, 2008).

Desse modo, no presente estudo, padronizou-se um delineamento experimental em que a administração sistêmica da ketamina é realizada no mesmo momento temporal quando se pretende analisar seu efeito tipo-antidepressivo rápido ou sustentado, variando-se apenas o momento do teste, o qual é realizado 1 hora ou 7 dias após o tratamento, respectivamente.

É importante mencionar que, conforme já citado na introdução, a ketamina pode ser apresentada em diferentes preparações químicas e farmacêuticas, de tal forma que a maioria se encontra como uma mistura racêmica (iguais proporções dos isômeros S(+) e R(-); (±)-ketamina), mas também têm se tornado mais acessíveis formulações dos enantiômeros puros S(+) ou R(-). Esses enantiômeros, por sua vez, diferem em cinética e dinâmica na interação com o receptor NMDA, de tal forma que a S(+)-ketamina apresenta uma afinidade aproximadamente 4 vezes maior por esse receptor e uma maior potência anestésica se comparada ao isômero R(-) (Domino, 2010).

No entanto, um estudo recente realizado por Zhang e colaboradores (2014) com camundongos jovens submetidos a exposição neonatal com dexametasona (corticoesteróide sintético), revelou que a R(-)-ketamina, mas não a S(+) (10 mg/Kg), foi capaz de reverter o aumento do tempo de imobilidade induzido pela dexametasona 7 dias após o tratamento, de tal forma que a R(-)-ketamina parece ser mais potente para o efeito antidepressivo, além de não ter apresentado efeitos colaterais psicotomiméticos. Assim, os dados sugerem que a escolha da preparação de ketamina pode influenciar sobre a análise da variável de interesse e seu uso pode ser mais ou menos “adequado” em decorrência da finalidade, por exemplo, indução de anestesia ou efeitos psicotomiméticos *versus* ação antidepressiva.

No presente estudo, foram realizados experimentos apenas com a S(+)-ketamina e a mistura racêmica, pois, infelizmente, não foi possível a obtenção do isômero R(-) isolado. Os resultados obtidos com camundongos submetidos ao FST

24 horas após o tratamento não revelaram quaisquer diferenças entre os dois tratamentos, enquanto os resultados obtidos com ratos submetidos ao teste após 1 hora ou 7 dias (reexposição dos mesmos animais), revelaram um efeito tipo-antidepressivo ligeiramente pronunciado após tratamento com a S(+)-ketamina, se comparada à mistura racêmica. O isômero dextrógiro foi, assim, escolhido para ser utilizado nos experimentos posteriores, na contramão dos trabalhos que aqui tentou-se reproduzir, os quais utilizaram a ketamina racêmica, proveniente de diferentes fabricantes (Autry *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Maeng *et al.*, 2008).

Grupos independentes de ratos tratados com S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg foram, ainda, submetidos ao teste do campo aberto, utilizando o mesmo delineamento experimental em que tais drogas apresentaram efeito tipo-antidepressivo no FST, e não foi observado aumento da atividade locomotora dos animais 1 hora ou 7 dias após tratamento, indicando que os efeitos apresentados no FST não são decorrentes de falso-positivos.

Em conjunto, os resultados aqui apresentados revelam que a análise do efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração de antagonistas do receptor NMDA em ratos ou camundongos submetidos ao FST pode sofrer a influência de diversos parâmetros, bem como ocorre com muitas outras classes de drogas que são testadas usualmente neste modelo animal. Isso reitera a importância de se refenciar nos trabalhos a maior gama de detalhes possíveis para aumentar a reprodutibilidade dos dados e resultados, apresentando, por exemplo, informações sobre os animais utilizados (espécies, linhagens, idade, condições de alojamento), drogas (procedência, dose, preparação química e farmacêutica, veículo e diluição), condições ambientais (temperatura e período dos experimentos) e desenho experimental. Com foco para o efeito da ketamina, foi observado que alterações nos seguintes parâmetros podem induzir modificações na resposta comportamental dos animais submetidos ao FST:

- Espécie animal utilizada;
- Dose da ketamina (doses sub-anestésicas ou doses maiores);
- Preparações químicas do fármaco (mistura racêmica ou isômero dextrógiro);
- Intervalo de tempo entre o pré-teste, tratamento e teste do FST para ratos ou entre tratamento e teste para camundongos;

- Uso de grupos independentes ou reexposição dos mesmos animais ao teste para análise do efeito sustentado.

Esses parâmetros, por sua vez, parecem exercer influências principalmente sobre a observação do efeito tipo-antidepressivo sustentado induzido pela ketamina, o qual foi analisado aqui em animais submetidos ao FST 24 horas ou 7 dias após tratamento. Convém, ainda, ressaltar, que outras diversas modificações metodológicas possíveis não foram analisadas nessa revisão ou reproduzidas de forma idêntica aos trabalhos aqui referenciados para a realização dos experimentos, tais como: diâmetro do cilindro, profundidade e temperatura da água ou método de quantificação do tempo de imobilidade utilizados para o FST e condições de alojamento, idade e peso dos animais. Neste estudo, tais parâmetros foram padronizados para todas as análises conduzidas com ratos ou com camundongos, conforme descrito nos procedimentos experimentais (item 3.2.3.1) e, além disso, não foram analisadas as respostas comportamentais de diferentes linhagens para cada espécie animal aqui utilizada. Dessa forma, estudos adicionais são necessários no intuito da padronização de protocolos experimentais com elevados índices de reprodutibilidade no mundo constante à análise dos efeitos tipo-antidepressivo rápido e sustentado induzido pela ketamina em animais submetidos ao FST.

Para os parâmetros metodológicos aqui utilizados, foi delineado um protocolo experimental em que uma única administração sistêmica de S(+)-ketamina 10 mg/Kg é capaz de induzir um efeito-tipo antidepressivo rápido (1 hora) e sustentado (7 dias) em ratos submetidos ao FST, enquanto administração de MK-801 0,025 mg/Kg induz efeito rápido, mas não sustentado, no mesmo teste.

Capítulo 2

Experimentos Moleculares

Efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação do DNA.

4. CAPÍTULO 2

4.1. Contexto

A partir dos protocolos experimentais delineados e apresentados no capítulo 1 para análise do efeito tipo-antidepressivo induzido pelos antagonistas do receptor NMDA, ketamina e MK-801, no FST com ratos, tornou-se possível a investigação dos efeitos de tais tratamentos e do estresse sobre a metilação do DNA em etruturas encefálicas relacionadas ao controle da resposta emocional, objetivo principal do presente estudo, o qual foi realizado a partir da quantificação dos níveis de metilação global do DNA e expressão de DNMT3a e DNMT3b e será detalhado no presente capítulo.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Animais

Para a realização dos experimentos descritos nesse capítulo foram utilizados ratos Wistar de 280-300 gramas. A proveniência e manutenção destes se deram da mesma forma e condições descritas no capítulo 1 – item 3.2.1, assim como foram conduzidos os procedimentos experimentais, em acordo às diretrizes e aprovações de ética constantes a tal.

4.2.2. Drogas

Foram utilizadas: S(+)-ketamina (dextrocetamina; Cristália) 10 mg/Kg e MK-801 (Sigma) 0,025 mg/Kg, ambas antagonistas do receptor de glutamato do tipo NMDA, em doses que foram capazes de induzir um efeito tipo-antidepressivo no FST em ratos, conforme resultados demonstrados no capítulo 1.

Tais drogas foram dissolvidas em salina isotônica (veículo) imediatamente antes do uso e administradas por via intraperitoneal (1 ml/Kg).

4.2.3. Procedimentos experimentais

4.2.3.1. Coleta de tecidos e extração de proteínas nucleares, citoplasmáticas e DNA genômico

Os animais foram profundamente anestesiados com hidrato de cloral 5% (1 ml/Kg) e decapitados para remoção do encéfalo e dissecção das estruturas encefálicas (CF, HV e HD). As estruturas foram individualmente coletadas no gelo, em tubos contendo tampão PBS 1x (do inglês, *phosphate buffered saline*) para lavagem e, em seguida, prosseguiu-se com a extração de proteínas nucleares e citoplasmáticas utilizando os reagentes do kit NE-PER (#78835, Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante.

Brevemente, as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise contendo inibidor de protease (10% v/v; #P2714, Sigma-Aldrich) e incubadas no gelo por 10 minutos. Proteínas citoplasmáticas foram isoladas por centrifugação e, a partir do precipitado, foram extraídas as proteínas nucleares com um segundo tampão de lise por 40 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas e, então, o sobrenadante resultante continha as proteínas nucleares, enquanto o precipitado continha o DNA genômico. Todas as frações obtidas foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Foi realizado, ainda, um teste para avaliar a eficiência do protocolo utilizado e a obtenção das frações protéicas nucleares e citosólicas. Para tanto, amostras de tais frações foram analisadas de forma intercalada por Western Blotting, utilizando anticorpos contra proteínas conhecidas por estarem localizadas majoritariamente no citosol ou no núcleo (ver imagem representativa no APÊNDICE I).

4.2.3.2. Quantificação da metilação global do DNA

A partir do precipitado coletado no procedimento descrito acima (item 4.2.3.1), o DNA foi extraído usando o kit AxyPrep Blood Genomic DNA Mini-prep (AP- MN-BL-GDNA-50; Axygen Biosciences, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado através de um nano-espectrofotômetro (Nanophotometer P360, Implem, Alemanha) e, em seguida, digerido com as enzimas nuclease P1 (# P2640, Sigma-Aldrich; 2 U/µg de DNA, 4 horas, a 65°C em tampão de acetato 20 mM pH 5,3) e fosfatase alcalina (# N8630, Sigma-Aldrich; 1 U/µg de DNA, 2 horas, a 65°C em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5). O DNA digerido foi precipitado em etanol puro e 5M de NaCl, a -20°C por no mínimo 48 horas e, em seguida, centrifugado a 10000g durante 15 min. O sedimento foi ressuspenso em tampão TE (Tris 5 mM-HCl, EDTA 0,1 mM, pH 8,5) e o DNA metilado foi quantificado utilizando o kit de Metilação de DNA EIA (# 589324, Chemicals Cayman), uma reação de ELISA (do inglês, *enzyme-linked imunossorbent assay*), de acordo com as instruções do fabricante. A absorvância produzida no ensaio foi medida pelo leitor de placas SpectraMax 190 (versão 6.2.1, Molecular Devices, Sunnyvale, CA; absorbância de 280/260 nm). Várias concentrações de purificado 5-metil-2'-

desoxicitidina (fornecido pelo kit) foram utilizadas para construir a curva padrão e a concentração da amostra (ng/mL) foi calculada com base na equação logística de 4 parâmetros a partir dessa curva. Para diminuir a variabilidade inter-ensaios, os dados foram normalizados em função do controle (grupo veículo não estressado) de cada placa de ELISA analisada e expressos como porcentagem do controle.

4.2.3.3. Quantificação dos níveis de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi conduzida a partir de alíquotas da fração nuclear (obtidas conforme procedimento 4.2.3.1) e realizada pelo método de Bradford (#B6916, Sigma-Aldrich) para, posteriormente, normalizar a quantidade de amostra utilizada no ensaio de *Western Blotting*. Brevemente, foram adicionados 30 µL de amostra e 190 µL de Reagente de Bradford (Sigma Aldrich, Cat#B6916) em cada poço de uma microplaca. A densidade óptica foi quantificada a 595nm. Os valores de proteínas totais em µg/µL de amostra foram calculados com base em uma curva padrão de soroalbumina bovina (BSA; Sigma Aldrich, Cat#P0914) para cada ensaio.

4.2.3.4. Quantificação da expressão de DNMTs por *Western Blotting*

A expressão de DNMT3a e DNMT3b foi quantificada por *western blotting* -SDS PAGE nas frações protéicas nucleares. Brevemente, estas proteínas foram separadas por eletroforese em gel de acrilamida (100V, 3h em gel de acrilamida 8% e 15%) juntamente com um padrão de peso molecular (Kaleidoscope Prestaineined Standard, Bio Rad), adicionando sempre a mesma quantia de proteínas (em ug) para todas as amostras de um mesmo gel (a maior quantia possível para o volume do poço de acordo com os dados obtidos pelo método de Bradford, item 4.2.3.3).

Posteriormente, as proteínas foram transferidas (100V, 1h40min) para uma membrana de PVDF e, após o bloqueio com BSA 5% esta foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário policlonal adequado: anti-DNMT3a (#sc-20703, Santa Cruz), anti-DNMT3b (#sc-20704, Santa Cruz). A seguir, foi incubada por 2h com anticorpo secundário anti-rabbit IgG (#7074, Cell Signaling) conjugado à peroxidase.

A presença do complexo antígeno-anticorpo foi detectada por método colorimétrico, utilizando um kit comercial (#NEL300001EA, PearkinElmer). As membranas foram escaneadas (HPScanjet3800) e a densidade óptica das bandas detectadas foi quantificada através do software ImageJ (NIH).

Seguindo os mesmos procedimentos, também foi quantificada a expressão de Histona-H3 e GAPDH em todas as amostras, a fim de usar alguma dessas proteínas como controles da metodologia (normalizadores), com preferência para a Histona-H3 pelo fato das amostras serem provenientes de frações protéicas nucleares, onde atuam as DNMTs. Para isso, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-Histona-H3 (#9715, Cell Signalling) e anti-GAPDH (#sc-25778, Santa Cruz) *overnight* a 4°C e posteriormente com o mesmo anticorpo secundário utilizado para as demais proteínas (ver imagens representativas das bandas detectadas por cada anticorpo no APÊNDICE II).

O uso do normalizador (*loading control)* é um procedimento comum na condução do *Western Blotting*, tendo em vista que existe a possibilidade de que a quantia total de proteínas (pressuposta por ser igual entre todas as amostras no início do procedimento) transfira de forma desigual para a membrana. Isso envolve, por exemplo, utilização de anticorpos contra proteínas de alta abundância nas amostras (conhecidas como *housekeeping*), tais como o GAPDH para amostras de proteínas totais ou citoplasmáticas e a Histona-H3 para proteínas nucleares. No entanto, no presente estudo, foi observada uma variação significativa na expressão dessas proteínas em algumas condições analisadas, bem como tem sido revelado em diversos outros estudos em neurosciências (para revisão, ver: Li e Shen, 2013). Dessa forma, optou-se por apresentar incluso nos resultados do presente capítulo apenas os níveis de expressão de DNMTs encontrados, sem normalizá-los por quaisquer das proteínas *housekeeping* avaliadas, enquanto os resultados da expressão dos normalizadores separadamente e das DNMTs normalizadas por ambos GAPDH e Histona-H3 são apresentados no apêndice do estudo (APÊNDICES III a VI).

4.2.4. Desenho experimental

Conforme detalhado no capítulo 1, a partir da condução de testes comportamentais (FST e OFT) com ratos que receberam administração sistêmica aguda de antagonistas do receptor NMDA, foi possível delinear um protocolo experimental e as doses das drogas que são capazes de induzir um efeito-tipo antidepressivo rápido e/ou sustentado nos animais submetidos ao FST. Estes dados, por sua vez, foram utilizados para a posterior condução dos experimentos moleculares. Assim, de acordo com a figura 11, os procedimentos representados em 1 constam dos resultados já discutidos no capítulo anterior, enquanto os procedimentos representados em 2 referem-se aos testes moleculares, cujo desenho experimental será especificado abaixo.

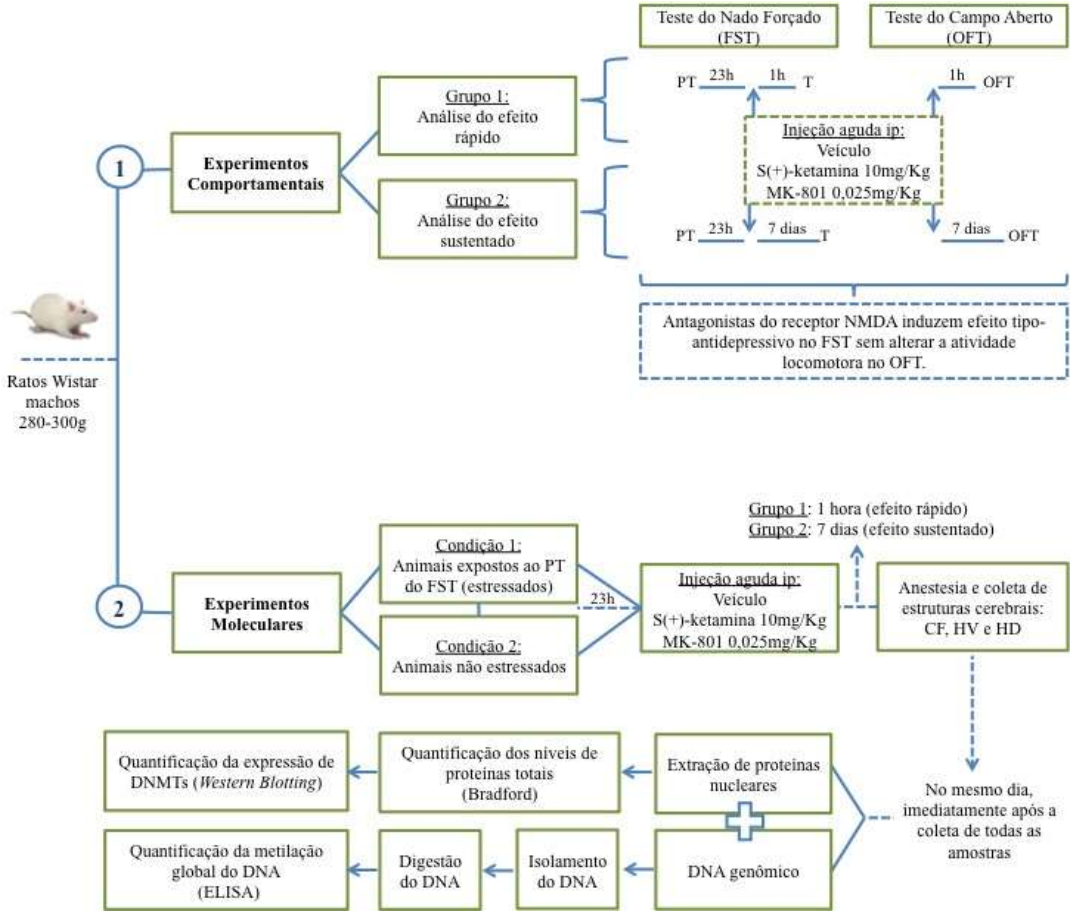

Figura 11. Desenho experimental do estudo. **1)** Experimentos comportamentais: Protocolo e doses delineados para análise do efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA em ratos submetidos ao FST. **2)** Experimentos moleculares: quantificação da expressão de DNMTs e metilação global do DNA em estruturas encefálicas de ratos tratados com antagonistas do receptor NMDA.

Experimento 1: Efeito rápido de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação global do DNA em estruturas encefálicas.

Um conjunto de animais foi separado, aleatoriamente, em dois subgrupos experimentais: não estressado (NS) e estressado (ST). Os animais do grupo ST foram submetidos à sessão pré-teste do FST (15min de nado forçado, realizado conforme metologia descrita no item 3.2.3.1.2 - capítulo 1) e, após 23 horas desse estresse, ambos os grupos foram divididos novamente de forma aleatória para receberem uma injeção i.p (1 ml/Kg) de MK-801 0,025 mg/Kg, S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou veículo. Decorrida 1 hora após o tratamento, os animais de todos os grupos foram anestesiados e sacrificados para coleta das estruturas encefálicas de interesse: CF, HV e HD.

A coleta de estruturas dos animais dos diferentes grupos ocorreu no mesmo período e dia, tendo sido repetidas para se atingir o número de animais/grupo adequado para análise, de modo que foram obtidas amostras de 6 grupos experimentais: 1) ST veículo; 2) ST S(+)-ketamina10 mg/Kg; 3) ST MK-801 0,025 mg/Kg; 4) ST veículo; 5) NS S(+)-ketamina 10 mg/Kg; 6) NS MK-801 0,025 mg/Kg.

Após a coleta dos tecidos cerebrais, imediatamente, prosseguiu-se com o protocolo de extração de proteínas nucleares, citoplasmáticas e DNA genômico, conforme detalhado no item 4.2.3.1 dos procedimentos experimentais. A quantificação do DNA metilado foi realizada conforme procedimento descrito em 4.2.3.2, após purificação e digestão do DNA genômico extraído.

Experimento 2: Efeito sustentado de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação global do DNA em estruturas encefálicas.

Grupos independentes de ratos foram separados, aleatoriamente, nos mesmos grupos experimentais do experimento 1. No presente experimento, no entanto, a coleta das estruturas cerebrais foi realizada apenas 7 dias após o tratamento, o qual também foi realizado 23 horas após o estresse no caso do grupo ST.

Após a coleta, foram utilizados os mesmos protocolos experimentais descritos no experimento 1 para quantificação dos níveis de metilação do DNA.

Experimento 3: Efeito rápido de antagonistas do receptor NMDA sobre a expressão de DNMTs em estruturas encefálicas.

Esse experimento foi realizado com a utilização das proteínas nucleares extraídas das mesmas amostras coletadas no experimento 1 (procedimento de extração descrito no item 4.2.3.1). Dessa forma, também foram utilizados os mesmos grupos experimentais, sendo que as amostras foram coletadas 1 hora após o tratamento sistêmico de ratos com antagonistas do receptor NMDA em um grupo NS e um grupo ST (tratamento do grupo ST 23 horas após o estresse do pré-teste do FST). Por consequência, medidas moleculares realizadas com as proteínas nucleares provenientes destas amostras referiam-se a um efeito rápido dos antagonistas do receptor NMDA.

Em cada amostra de fração nuclear foi realizada a quantificação dos níveis de proteínas totais utilizando o procedimento experimental descrito no item 4.2.3.3 para, então, conduzir o procedimento de *Western Blotting*, descrito no item 4.2.3.4, o qual foi realizado para quantificar a expresão de 2 proteínas de interesse:

Experimento 3.1: Efeito rápido - Quantificação de DNMT3a

Experimento 3.2: Efeito rápido - Quantificação de DNMT3b

Experimento 4: Efeito sustentado de antagonistas do receptor NMDA sobre a expressão de DNMTs em estruturas encefálicas.

Esse experimento foi realizado conforme o experimento 3, porém com as mesmas amostras provenientes do experimento 2, ou seja, quantificação de proteínas totais seguida de *Western Blotting* a partir de frações de proteínas nucleares extraidas das estruturas cerebrais coletas 7 dias após tratamento de ratos com S(+)-ketamina 10 mg/Kg, MK-801 0,025 mg/Kg ou veículo em grupos NS e ST. O experimento também foi subdividido para quantificação das proteínas de interesse:

Experimento 4.1: Efeito sustentado - Quantificação de DNMT3a

Experimento 4.2: Efeito sustentado - Quantificação de DNMT3b

4.2.5. Análise estatística

Os resultados dos experimentos moleculares foram comparados principalmente através da análise estatística two-way ANOVA, considerando os fatores tratamento e condição. O tratamento refere-se à administração sistêmica de antagonistas do receptor NMDA ou veículo em ratos, enquanto a condição refere-se à exposição ou não destes ao estresse do pré-teste do FST antes do tratamento farmacológico. Em casos em que foram encontradas diferenças significativas no fator condição, foi conduzida ainda análise através do teste t de Student entre os grupos veículo NS e veículo ST.

Vale considerar que, somado à importância de se observar a possível interação entre os fatores envolvidos nos experimentos, considerou-se também relevante o estudo dos efeitos do tratamento em cada condição de forma isolada, ou seja, análise dos efeitos nos animais do grupo NS e nos animais do grupo ST. Com isso, todos os resultados também foram analisados por one-way ANOVA seguida do pós-teste de Newman-Keuls e, em caso de diferenças significativas entre as variâncias foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Tal análise foi apresentada em detalhes nos resultados apenas quando foram encontrados efeitos significativos ou relevantes ao contexto.

Em todos os casos, diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

4.3. Resultados

Experimento 1: Efeito rápido do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação global do DNA em estruturas encefálicas.

Administração sistêmica aguda de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg, assim como a exposição de ratos ao pré-teste do FST, não induzem alterações significativas na metilação global do DNA quantificada em estruturas encefálicas (CF, HV e HD) de ratos 1 hora após o tratamento.

Para a análise do efeito em cada estrutura foi utilizado o teste two-way ANOVA considerando os fatores tratamento e condição (estresse) e os resultados obtidos seguem detalhados:

CF: Tratamento: [$F(2,33)=1,83$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,33)=2,68$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,33)=0,02$, $p>0,05$; Figura 12A];

HV: Tratamento: [$F(2,48)=2,16$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,48)=0,97$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,48)=1,73$, $p>0,05$; Figura 12B];

HD: Tratamento: [$F(2,46)=0,75$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,46)=0,76$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,46)=0,68$, $p>0,05$; Figura 12C] .

Esse resultado estatístico indica que o estresse e os antagonistas do receptor NMDA, quando administrados nas mesmas doses e protocolos experimentais que induzem um efeito tipo-antidepressivo rápido no FST em ratos, não induzem efeitos significativos sobre a metilação global do DNA em estruturas encefálicas como CF, HV e HD. No entanto, como é possível observar no gráfico, existe uma aparente elevação dos níveis de DNA metilado após tratamento com ambos antagonistas glutamatérgicos no CF de animais estressados e não estressados. O mesmo ocorre no HV de animais não-estressados tratados com S(+)-ketamina 10 mg/Kg. Sugere-se, assim, que o resultado estatístico relatado pode ser decorrente de um grande erro amostral, o que será melhor detalhado na discussão desse capítulo.

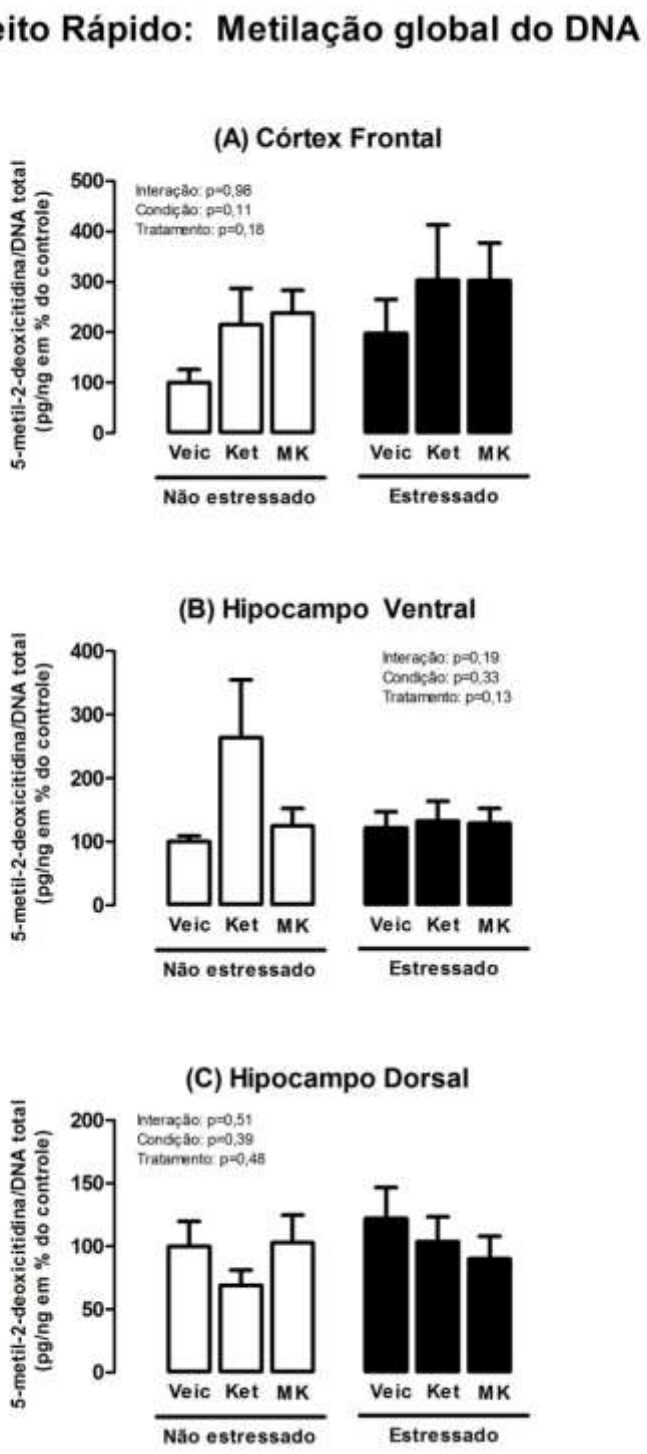

Figura 12. Efeito rápido do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre os níveis de metilação global do DNA no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos. Os animais foram submetidos ao pré-teste do FST 23h antes do tratamento (colunas pretas) ou apenas ao tratamento (colunas brancas) e as amostras foram coletadas 1h após a administração farmacológica (n=6-10/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA.

Experimento 2: Efeito sustentado do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação global do DNA em estruturas encefálicas.

Análise estatística por two-way ANOVA, considerando os fatores tratamento e condição, indicou que a administração sistêmica aguda de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg, bem como a exposição ao estresse, não induzem alterações significativas na metilação global do DNA quantificada em estruturas encefálicas (CF, HV e HD) dos animais 7 dias após o tratamento.

CF: Tratamento: [$F(2,47)=0,68$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,47)=0,01$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,47)=0,03$, $p>0,05$; Figura 13A];

HV: Tratamento: [$F(2,51)=2,09$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,51)=0,09$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,51)=1,11$, $p>0,05$; Figura 13B];

HD: Tratamento: [$F(2,43)=0,16$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,43)=0,01$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,43)=2,46$, $p>0,05$; Figura 13C].

Isso poderia indicar que o estresse e os antagonistas do receptor NMDA, quando administrados nas mesmas doses e protocolos experimentais que induzem um efeito tipo-antidepressivo sustentado no FST em ratos, não promovem efeitos significativos sobre a metilação global do DNA nas estruturas encefálicas analisadas. No entanto, no HD houve uma tendência para interação entre os fatores analisados ($p=0,09$). Tendo isso, procedeu-se a condução de análise estatística por One-way ANOVA nos grupos NS e ST separadamente, a qual confirmou a análise anterior [NS: $F(2,24)=0,72$, $p>0,05$; ST: $F(2,19)=2,16$, $p>0,05$], enquanto Teste t de Student revelou uma diferença significativa entre os grupos veic NS e veic ST [$t(15)=2,328$, $p<0,05$; Figura 13C], sugerindo que o estresse aumenta a metilação global do DNA no HD de animais não tratados com os antagonistas do receptor NMDA.

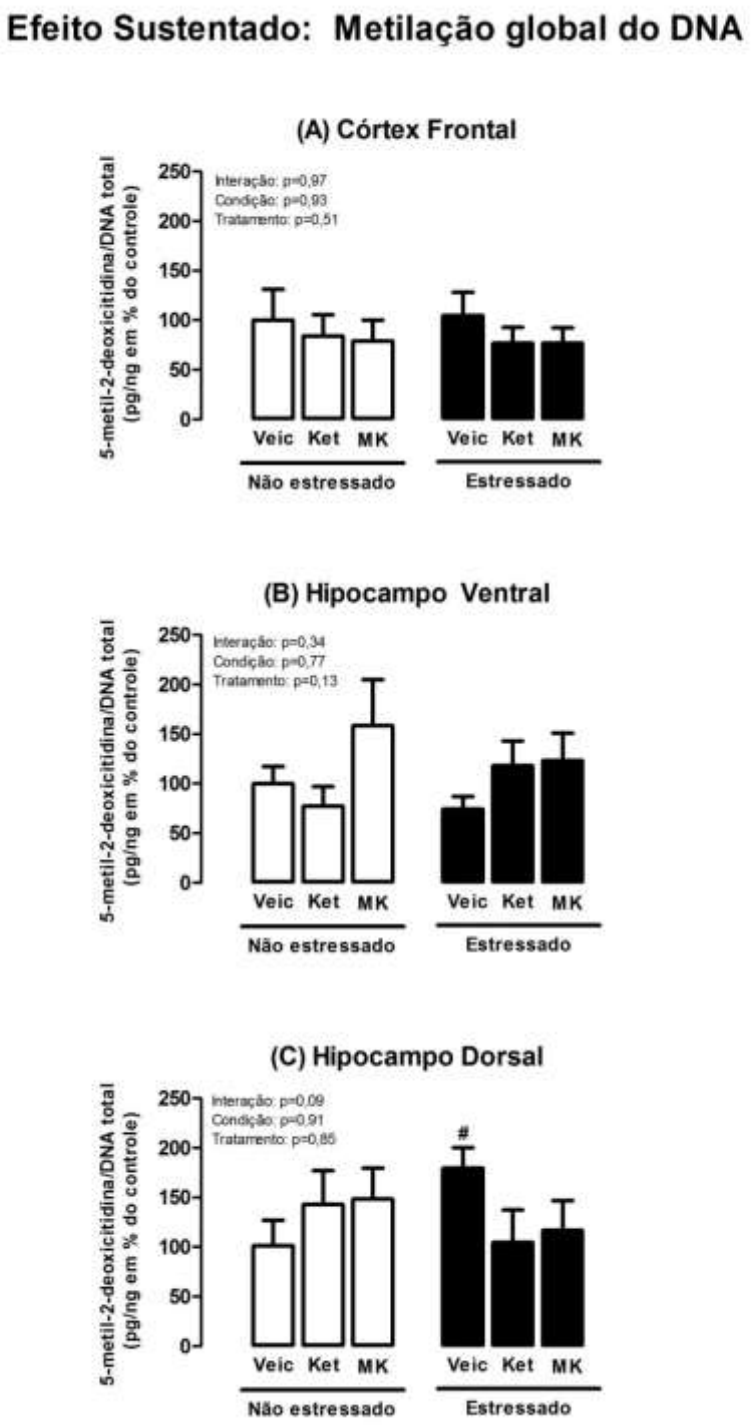

Figura 13. Efeito sustentado do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre os níveis de metilação global do DNA no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos. Os animais foram submetidos ao pré-teste do FST 23h antes do tratamento (colunas pretas) ou apenas ao tratamento (colunas brancas) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica (n=6-10/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA. (C) #p<0,05 veic estressado *versus* veic não estressado (Teste t de Student).

Experimento 3: Efeito rápido do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a expressão de DNMTs em estruturas encefálicas.

Tratando-se dos resultados abaixo demonstrados, relativos aos experimentos 3 e 4, vale ressaltar que os níveis de expressão de DNMTs não estão normalizados por nenhuma proteína *housekeeping*, pois conforme já citado no item 4.2.3.4 (Material e Métodos do presente capítulo) foram observadas variações significativas na expressão destas proteínas (no caso, GAPDH e Histona-H3) em algumas condições analisadas neste estudo. Ressalta-se também que optou-se pela apresentação dos dados dessa maneira partindo do pressusposto de que não ocorreram variações significativas na quantia de proteínas totais presente na membrana, lembrando que no início do procedimento de *Western Blotting* haviam quantidades iguais de proteínas para todas as amostras analisadas. Para conhecimento, os resultados da expressão dos normalizadores separadamente e das DNMTs normalizadas por ambos GAPDH e Histona-H3 são apresentados no apêndice do presente estudo.

Experimento 3.1: Efeito rápido - Quantificação de DNMT3a

A administração sistêmica aguda dos antagonistas do receptor NMDA S(+)-ketamina 10 mg/Kg e MK-801 0,025 mg/Kg em ratos, bem como a exposição destes ao estresse do pré-teste do FST, não induzem alterações significativas na expressão da enzima DNMT3a no CF, HV e HD dos animais 1 hora após o tratamento, assim como não há uma interação entre tais fatores (tratamento e condição). Isso foi revelado pela análise estatística por two-way ANOVA e os resultados detalhados seguem abaixo descritos:

CF: Tratamento: [$F(2,68)=0,20$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,68)=1,19$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,68)=0,46$, $p>0,05$; Figura 14A];

HV: Tratamento: [$F(2,60)=0,17$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,60)=2,21$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,60)=0,68$, $p>0,05$; Figura 14B];

HD: Tratamento: [$F(2,59)=0,47$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,59)=0,90$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,59)=0,66$, $p>0,05$; Figura 14C].

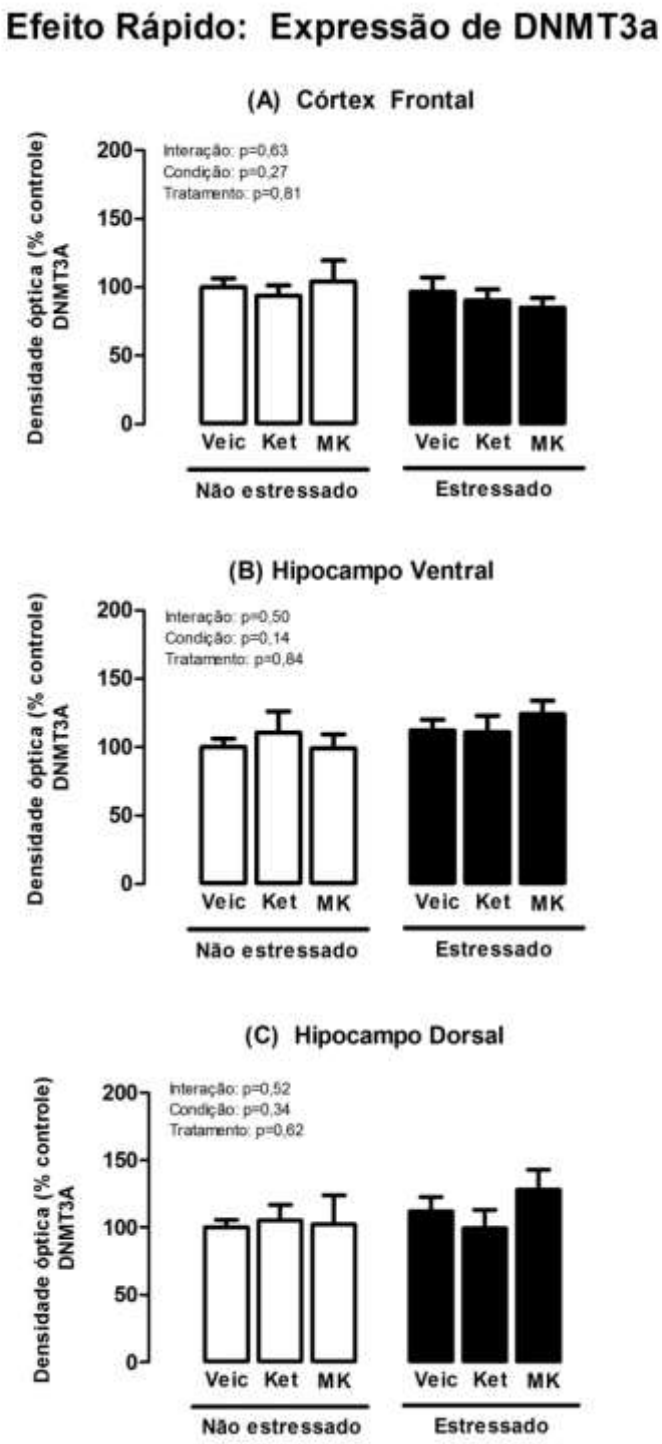

Figura 14. Efeito rápido do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre a expressão de DNMT3a no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos. Os animais foram submetidos ao pré-teste do FST 23h antes do tratamento (colunas pretas) ou apenas ao tratamento (colunas brancas) e as amostras foram coletadas 1 hora após a administração farmacológica (n=6-13/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA.

Experimento 3.2: Efeito rápido - Quantificação de DNMT3b

Não foram encontradas alterações significativas na expressão de DNMT3b em estruturas encefálicas (CF, HV e HD) de ratos 1 hora após o tratamento com S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg, assim como a exposição ao estresse do pré-teste do FST também não alterou tal expressão. Isso foi apontado pela análise estatística two-way ANOVA considerando os fatores tratamento e condição (estresse), com os seguintes resultados:

CF: Tratamento: [$F(2,32)=0,13$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,32)=0,67$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,32)=0,37$, $p>0,05$; Figura 15A];

HV: Tratamento: [$F(2,38)=2,03$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,38)=2,44$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,38)=0,21$, $p>0,05$; Figura 15B];

HD: Tratamento: [$F(2,43)=0,25$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,43)=1,78$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,43)=1,64$, $p>0,05$; Figura 15C].

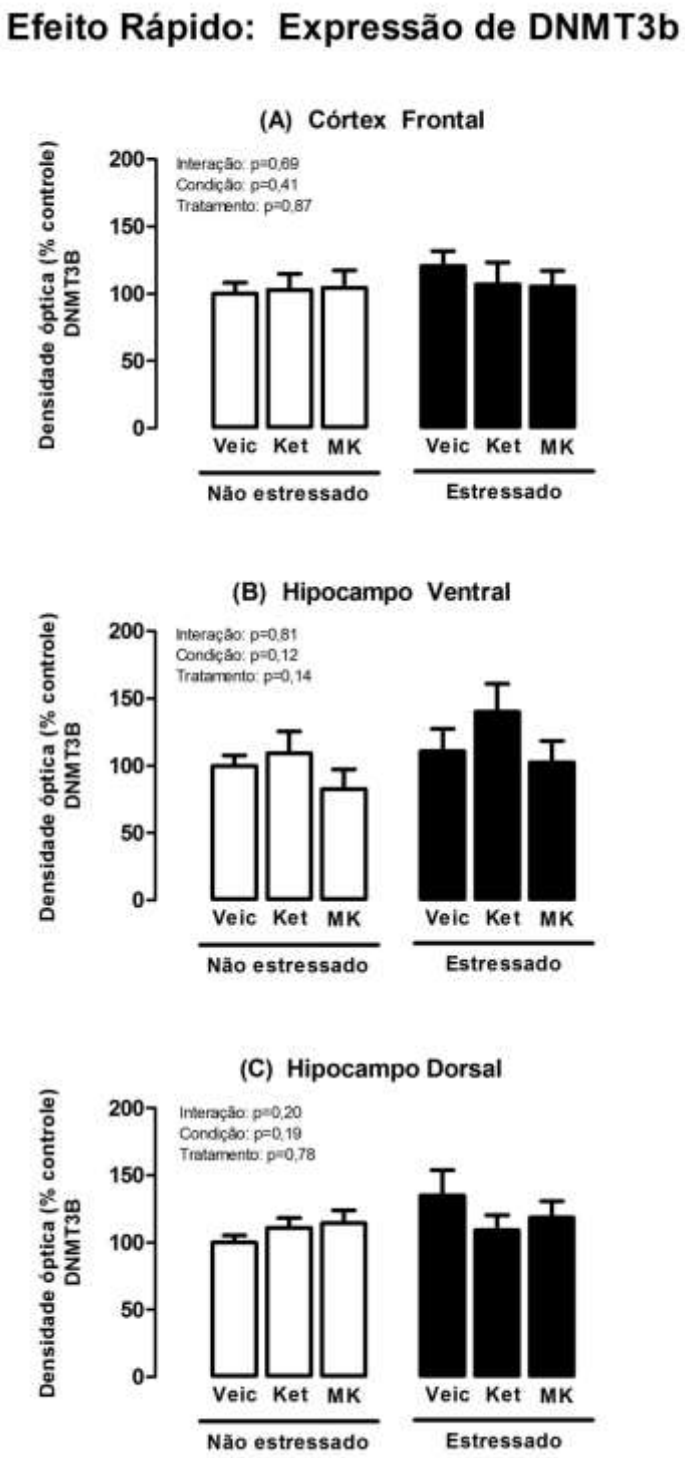

Figura 15. Efeito rápido do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre a expressão de DNMT3b no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos. Os animais foram submetidos ao pré-teste do FST 23h antes do tratamento (colunas pretas) ou apenas ao tratamento (colunas brancas) e as amostras foram coletadas 1 hora após a administração farmacológica (n=5-11/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA.

Experimento 4: Efeito sustentado do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a expressão de DNMTs em estruturas encefálicas.

Experimento 4.1: Efeito sustentado - Quantificação de DNMT3a

Análise estatística two-way ANOVA indicou que a administração sistêmica aguda dos antagonistas do receptor NMDA S(+)-ketamina 10 mg/Kg e MK-801 0,025 mg/Kg em ratos, bem como a exposição destes ao estresse do pré-teste do FST, não induzem alterações significativas na expressão da enzima DNMT3a no CF, HV e HD dos animais 7 dias após o tratamento, assim como não há uma interação entre tais fatores (tratamento e condição), conforme os seguintes dados:

CF: Tratamento: [$F(2,38)=0,14$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,38)=0,01$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,38)=1,05$, $p>0,05$; Figura 16A];

HV: Tratamento: [$F(2,30)=1,31$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,30)=0,89$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,30)=0,53$, $p>0,05$; Figura 16B];

HD: Tratamento: [$F(2,49)=2,53$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,49)=0,79$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,49)=1,08$, $p>0,05$; Figura 16C].

No entanto, no HD, houve uma tendência para o fator tratamento ($p=0,08$). Nesse caso, análise estatística dos grupos NS e ST separadamente, apontou um aumento significativo da expressão de DNMT3a no HD dos animais não estressados e tratados com MK-801 0,025 mg/Kg, enquanto nenhuma alteração significativa foi encontrada no grupo ST:

NS: $H=5,876$, $p<0,05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn);

ST: $F(2,25)=0,20$, $p>0,05$ (One-way ANOVA).

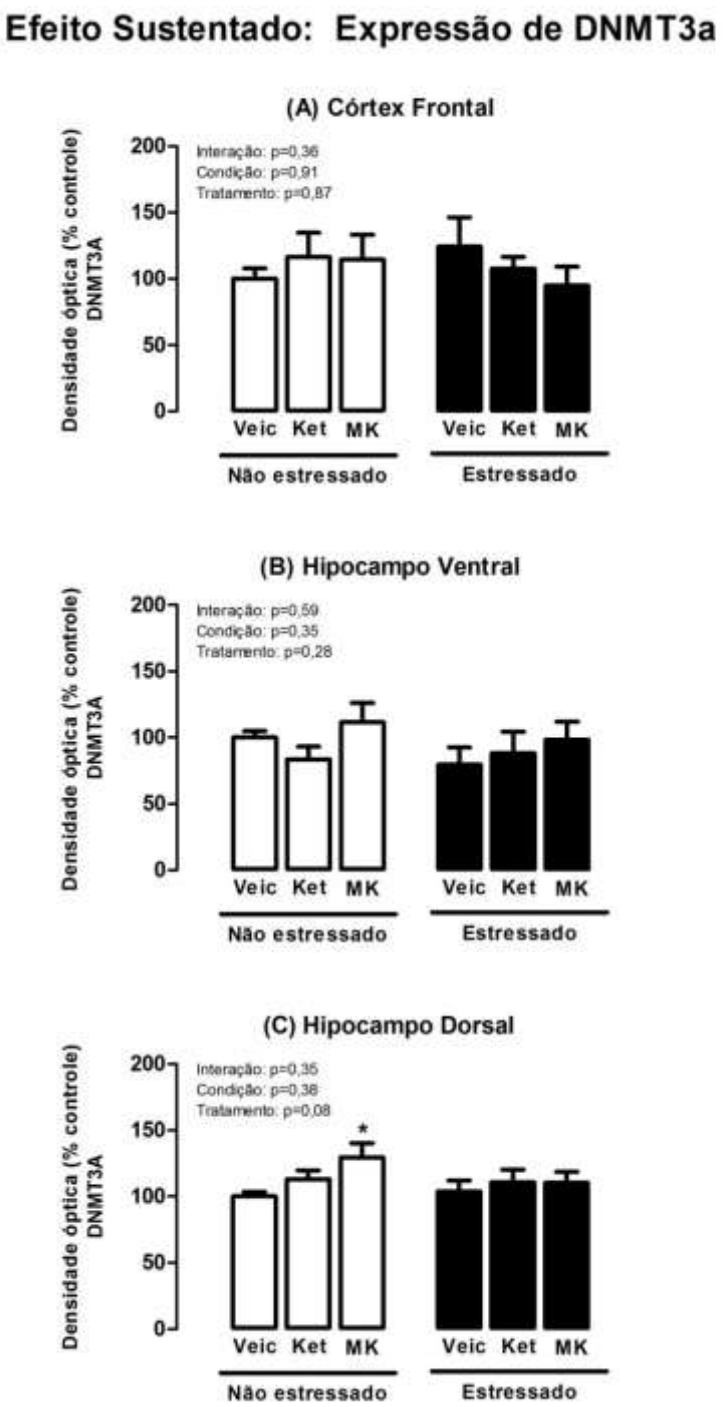

Figura 16. Efeito sustentado do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre a expressão de DNMT3a no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos. Os animais foram submetidos ao pré-teste do FST 23h antes do tratamento (colunas pretas) ou apenas ao tratamento (colunas brancas) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica (n=6-10/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA. (C) *p<0,05 grupo MK não estressado *versus* veic não estressado (Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

Experimento 4.2: Efeito sustentado - Quantificação de DNMT3b

Análise estatística por two-way ANOVA, considerando os fatores tratamento e condição, indicou que a administração sistêmica aguda de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg, bem como a exposição ao pré-teste do FST, não induzem alterações significativas na expressão de DNMT3b quantificada, 7 dias após o tratamento, no CF, HV e HD, conforme os seguintes resultados:

CF: Tratamento: [$F(2,32)=1,73$ $p>0,05$]; Condição: [$F(1,32)=0,03$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,32)=1,75$, $p>0,05$; Figura 17A];

HV: Tratamento: [$F(2,46)=1,23$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,46)=1,34$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,46)=0,05$, $p>0,05$; Figura 17B];

HD: Tratamento: [$F(2,38)=1,06$, $p>0,05$]; Condição: [$F(1,38)=0,98$, $p>0,05$]; Interação: [$F(2,38)=0,35$, $p>0,05$; Figura 17C].

Isso poderia indicar que o estresse e os antagonistas do receptor NMDA, quando administrados nas mesmas doses e protocolos experimentais que induzem um efeito tipo-antidepressivo sustentado no FST em ratos, não possuem efeitos significativos sobre a expressão dessa enzima nas estruturas analisadas. Porém, análise estatística por One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls apontou um aumento significativo de tal expressão no CF de animais não estressados e tratados com ketamina se comparados ao seu respectivo grupo veículo [$F(2,17)=4,29$, $p<0,05$; Figura 17A], o que sugere que, de alguma forma, os fatores analisados poderiam interagir com uma relevância biológica, embora não estatisticamente significativa.

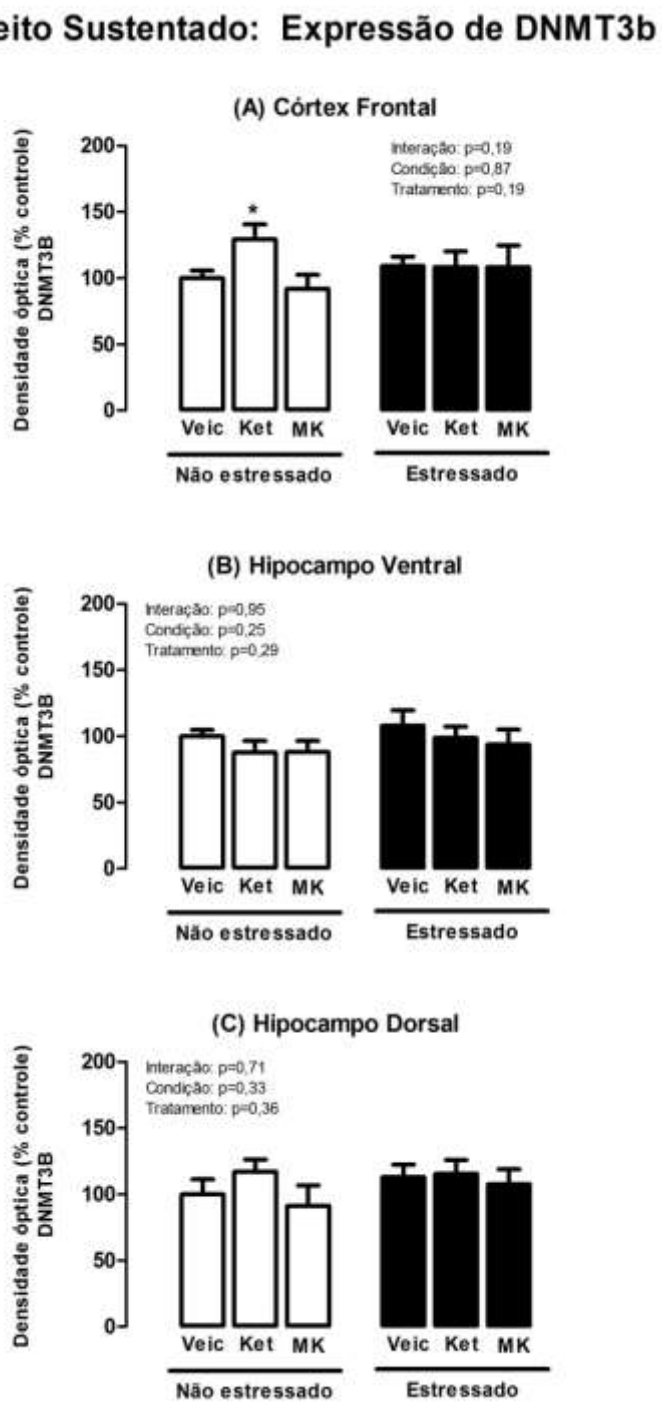

Figura 17. Efeito sustentado do estresse e da administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK) sobre a expressão de DNMT3b no córtex frontal **(A)**, hipocampo ventral **(B)** e dorsal **(C)** de ratos. Os animais foram submetidos ao pré-teste do FST 23h antes do tratamento (colunas pretas) ou apenas ao tratamento (colunas brancas) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica (n=6-10/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA. (A) *p<0,05 grupo Ket não estressado *versus* veic não estressado (One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls).

4.4. Discussão

Os resultados apresentados demonstram que não há uma interação significativa entre os efeitos do tratamento com antagonistas do receptor NMDA (S(+)-ketamina e MK-801) e os efeitos subsequentes à exposição de animais ao estresse de nado forçado sobre a metilação global do DNA ou os níveis de DNMTs, quantificados 1 hora ou 7 dias após o tratamento, em estruturas encefálicas relacionadas ao controle da resposta emocional (CF, HV e HD). No entanto, embora as análises estatísticas comparando os fatores condição e tratamento em conjunto não tenham apontado diferenças significativas em nenhuma das medidas moleculares realizadas, foi possível perceber uma alteração relevante na média de alguns grupos tratados, se comparados ao grupo veículo, em alguns dos gráficos aqui apresentados. Sendo assim, é possível que a ausência de efeito significativo possa estar relacionada ao erro amostral dos dados obtidos.

Corroborando isso, a análise dos efeitos da administração farmacológica sobre a metilação do DNA nos animais não estressados ou estressados separadamente, apontou que a administração sistêmica dos antagonistas do receptor NMDA pode induzir um aumento dos níveis de DNMTs em estruturas encefálicas de animais não estressados, sendo que tal aumento foi significativo para expressão de DNMT3a no HD de animais tratados com MK-801 e DNMT3b no CF de animais tratados com a S(+)-ketamina, ambos quantificados 7 dias após a administração farmacológica, o que corresponde ao efeito sustentado das drogas. O mesmo ocorreu para a condição, ou seja, o seu efeito foi pronunciado quando analisado de forma isolada, dado que pôde ser observado, também após tempo relativo ao efeito sustentado do estresse, um aumento significativo da metilação global do DNA no HD dos animais do grupo veículo estressado comparados aos do grupo veículo não estressado.

No entanto, os resultados aqui apresentados possuem diversas limitações e ressalvas. Com relação ao erro padrão da média (epm) apresentado por alguns grupos nos gráficos relativos à metilação global do DNA, deve-se considerar que antes de realizar o ELISA propriamente dito foram necessários 6 passos adicionais (exposição ao pré-teste, injeção, coleta das estruturas, extração nuclear, purificação do DNA e digestão do DNA), de tal forma que pequenas diferenças existentes em cada animal podem se somar a cada passo, ocasionando um grande erro ao final.

Além disso, existe uma variação entre os dias de coleta das estruturas, pois, dado que a extração nuclear deve ser feita com a amostra recém-coletada (no mesmo dia), faz-se necesssário distribuir os animais dos diferentes grupos experimentais em diversos dias de coleta. Consequentemente, a análise molecular posterior também está sob influência de variações em fatores ambientais, por exemplo.

Somado a isso, outra fonte de erro pode ser os materiais utilizados, ou seja, tampões, kits comerciais e placas de ELISA. Nesse caso, cuidou-se para distribuir os grupos experimentais entre os diversos materiais utilizados e, considerando a placa de ELISA como um ponto crítico para a quantificação da metilação do DNA, optou-se por normalizar os resultados finais dessa medida por cada placa utilizada, ou seja, considerar a média da metilação do DNA encontrada para os animais do grupo veículo não estressado em cada placa como 100%. Dessa forma, é possível minimizar a variação entre os dias de experimento e a placa de ELISA utilizada para quantificação.

Analisando, ainda, que para a realização dos experimentos aqui apresentados foram utilizados os mesmos protocolos experimentais e doses dos antagonistas do receptor NMDA que foram capazes de induzir um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado (último apenas com S(+)-ketamina) em ratos submetidos ao FST, pode-se sugerir que os efeitos moleculares observados poderiam estar envolvidos, de algum modo, com os efeitos comportamentais induzidos pelo estresse e fármacos em questão.

Nesse sentido, considerando evidências como: (1) o antidepressivo clássico imipramina reverte os efeitos do estresse através da hiperacetilação de histonas em regiões promotoras do BDNF no hipocampo de camundongos (Tsankova *et al.*, 2006); (2) administração sistêmica ou injeção direta em diversas regiões cerebrais de inibidores da HDAC revertem os sintomas tipo-depressivos induzidos pelo estresse (Covington *et al.*, 2009) e (3) administração sistêmica e hipocampal de inibidores de DNMTs induz efeito tipo-antidepressivo no FST (Sales *et al.*, 2011), poderia-se sugerir que o efeito tipo-antidepressivo observado está relacionado a uma facilitação da transcrição e aumento da expressão gênica, seja por aumento da acetilação de histonas ou diminuição da metilação do DNA.

No entanto, a maioria dos dados disponíveis na literatura correlacionam o efeito antidepressivo com alterações em mecanismos epigenéticos que ocorrem em

regiões promotoras de genes específicos, como o BDNF aqui citado e, nesse âmbito se enquadra outro relevante viés do presente estudo, dado que a metilação do DNA foi quantificada de forma global, ou seja, o resultado observado representa a metilação na estrutura como um todo, de forma gene-inespecífica. Com isso, pode ser que ocorra, por exemplo, uma redução da metilação em alguns genes e aumento em outros, o que resultaria em um balanço geral que poderia não corresponder a nenhuma destas alterações. De fato, sabe-se que alguns genes sofrem redução da metilação de DNA e consequente aumento da sua expressão em resposta ao estresse, como é o caso do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (Chen *et al.*, 2012), enquanto outros genes são hipermetilados com tal estímulo, como o gene do BDNF (Toledo-Rodriguez *et al.*, 2010). Assim, nem sempre o efeito do estresse está relacionado a um aumento dos níveis de metilação global do DNA em estruturas cerebrais, bem como o efeito tipo-antidepressivo pode não ser relacionado a uma redução destes níveis.

Além disso, a quantificação da metilação do DNA pode não refletir um efeito sobre a transcrição e expressão gênica com consequente codificação de proteínas importantes para o efeito observado no estudo. Tem-se, por exemplo, que apesar de muitas evidências suportarem que as regiões promotoras de quase todos os genes expressos constitutivamente apresentem-se co-localizadas com ilhas CpGs (Larsen *et al.*, 1992), que são alvos da metilação com papel funcional de repressão da transcrição gênica (Stein *et al.*, 1982), diversos genes não apresentam correlação entre o estado transcricional e as ilhas CpGs hipermetiladas (Oakes *et al.*, 2007). Isso ocorre possivelmente porque estas também são localizadas em regiões intergênicas, fora de promotores, com funções regulatórias que permanecem desconhecidas (Eckhardt *et al.*, 2006). Há também o *imprinting* genômico ou parental, fenômeno genético pelo qual certos genes são expressos apenas por um alelo (Keverne, 2014), de tal forma que, mesmo que ocorra metilação, ela pode estar em um alelo que não influencia na expressão de um determinado gene. Com isso, o aumento da metilação deste alelo, embora acarrete elevação nos níveis de metilação global, não reduz a codificação de certas proteínas.

Apesar de todas essas ressalvas à metodologia empregada, os experimentos com quantificação da metilação global do DNA após estresse e administração de antagonistas do receptor NMDA poderiam abrir alguns caminhos para próximos

estudos a partir da formulação de questões mais específicas a serem elucidadas, focando, por exemplo, em determinadas estruturas encefálicas e/ou análise da metilação em genes candidatos para promoção do efeito antidepressivo. Nesse âmbito, para esclarecer os reais efeitos dos fatores estudados sobre a metilação do DNA, inclui-se como uma ferramenta complementar e importante a quantificação da expressão de DNMTs.

Conforme explanado na introdução do presente estudo, três dos subtipos conhecidos de enzimas DNMTs são funcionais e amplamente estudadas: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A DNMT1, também conhecida como uma metilase de manutenção, é expressa em altos níveis durante a embriogênese e maturação no cérebro, estando mais relacionada, de modo geral, com a propagação da metilação durante as gerações (Hermann *et al.*, 2004), enquanto as DNMTs 3a e 3b associam-se às novas metilações ("de novo") (Jeltsch, 2006). No presente estudo, no entanto, foi quantificada a expressão apenas das DNMTs 3a e 3b devido a algumas limitações reveladas no percurso dos experimentos com o anticorpo anti-DNMT1 utilizado e o Western Blotting conduzido para análise dessa proteína. Sabe-se que isto também é uma limitação do trabalho, tendo em vista evidências que revelam a importância da DNMT1 para a neurobiologia da depressão e o seu tratamento, tais como as alterações nos níveis de DNMT1 reportadas em regiões cerebrais (como CPF) de suicidas deprimidos (Poulter *et al.*, 2008) e a atenuação da atividade dessa enzima induzida por antidepressivos em cultura de astrócitos (Zimmermann *et al.*, 2012). Sugere-se, assim, novas tentativas e alterações metodológicas para também quantificar os níveis de DNMT1 em estudos posteriores.

Além disso, com relação a quantificação dos níveis de DNMT3 realizada, vale considerar que, conforme já citado na metodologia e resultados deste capítulo, de forma inesperada, para algumas condições analisadas no presente estudo foram observadas alterações significativas na expressão *per se* de proteínas *housekeeping,* Histona-H3 e GAPDH. Estas foram quantificadas em todas as amostras e seriam utilizadas como possíveis normalizadores (*loading control*) da densidade óptica obtida por *Western Blotting* para DNMT3a e DNMT3b, um procedimento comum na condução desta metodologia, tendo em vista que existe a possibilidade de que a quantia total de proteínas (pressuposta por ser igual entre

todas as amostras no início do procedimento) transfira de forma desigual para a membrana a ser analisada.

Poderia-se supor, então, que as alterações encontradas para a expressão de GAPDH e Histona-H3 estariam relacionadas a uma variação na quantia total de proteínas transferidas para a membrana. No entanto, uma comparação entre os resultados obtidos para a expressão das DNMTs e a expressão das proteínas *housekeeping*, revelam que não existe uma correlação homogênea para as alterações observadas em cada proteína. Na análise do efeito sustentado, o tratamento com MK-801, por exemplo, aumentou significativamente a expressão de DNMT3a *per se* no HD dos animais não estressados e o mesmo ocorreu com os níveis de GAPDH nas mesmas condições, porém tal aumento não foi revelado para a Histona-H3. Da mesma forma, enquanto o tratamento com S(+)-ketamina aumentou significativamente a expressão de DNMT3b *per se* no CF de animais não estressados, os níveis de GAPDH e Histona-H3 não foram alterados nestas condições, apresentando apenas leve aumento visível graficamente, porém nem próximo a uma tendência estatística.

De fato, diversas evidências revelam que os níveis das proteínas *housekeeping* estão sujeitos a variações sob muitas condições biológicas, como em neuropatologias, tratamentos experimentais e drogas (Aldridge *et al.*, 2008; Greer *et al.*, 2010), fase do ciclo celular, diferenciação (Said *et al.*, 2009) ou estado de proliferação e idade (Lowe *et al.*, 2000). Sikand e colaboradores (2012), por exemplo, demonstraram que a inibição ou superexpressão in vitro do miR644-a regula a expressão de GAPDH e β-actina, sugerindo que estas proteínas não deveriam ser utilizadas como controles para normalização dos níveis de miRNAs. Outro trabalho bastante recente conduzido por Lee e colaboradores (2016), explorou uma base de dados proteômica humana e notou que, surpreendentemente, a β-actina, uma das proteínas *housekeeping* mais populares utilizadas para normalizar resultados do *Western Blotting*, apresentou uma alta porcentagem observada para a razão do desvio padrão da média (CV = 58,4%). Em conjunto, esses dados levantam uma questão potencialmente grave de que o uso de proteínas *housekeeping* como controle para normalização dos níveis da proteína alvo pode, em alguns casos, resultar em falso-positivos, guiando os pesquisadores a conclusões inválidas.

Então, recentemente, muitos trabalhos têm sugerido utilizar a coloração de proteínas totais como uma alternativa ao uso das proteínas *housekeeping*. Esta pode ser realizada através de diferentes métodos, como coloração por *Ponceau, Comassie Blue, SYPRO Ruby* e *Amido Black*, sendo que crescentes evidências revelam que seu uso pode apresentar maior exatidão, precisão e reprodutibilidade para a normalização da expressão de proteínas quantificadas por *Western Blotting* (Gilda e Gomes, 2013; Li e Shen, 2013; Thacker *et al.*, 2016). Tem-se, assim, que a coloração de proteínas totais na membrana também poderia ser uma alternativa para a confirmação dos dados obtidos no presente estudo, lembrando que, de qualquer forma, a quantificação de proteínas totais no início do procedimento também é necessária (aqui realizada através do método de Bradford). Se confirmadas, as alterações observadas na expressão de GAPDH e Histona-H3 em algumas condições podem, ainda, ser interessantes de alguma maneira.

No caso do GAPDH, é importante notar que no presente estudo foram quantificados seus níveis na fração nuclear das amostras coletadas e, sendo assim, algumas evidências que apresentam diferentes papéis funcionais para essa proteina no núcleo tornam-se relevantes. Sabe-se, por exemplo, que a translocação nuclear de GAPDH participa no mecanismo de sinalização da morte celular neuronal (Sawa *et al.*, 1997) e foi demonstrado que, em cultura de células do cerebelo, o ácido valpróico, fármaco utilizado no tratamento do transtorno bipolar, inibe a atividade da HDAC, protegendo os neurônios da apoptose promovida por acúmulo de GAPDH nuclear induzido por aumento dos níveis de glutamato (Kanai *et al.*, 2004). Além disso, o GAPDH atua como mediador no mecanismo de nitrosilação de proteínas nucleares, sendo a S-nitrosilação um dos principais modos de sinalização de certas proteínas, incluindo por exemplo HDAC2 (Kornberg *et al.*, 2010). Então, considerando-se estas evidências e que elas apontam mecanismos que associam o GAPDH nuclear com toxicidade promovida por glutamato ou mecanismos epigenéticos, como a acetilação de histonas, torna-se mais aceitável a possibilidade de que o estresse ou a administração de antagonistas do receptor NMDA possam exercer efeitos sobre os níveis de GAPDH nuclear em determinadas estruturas cerebrais, como observado no presente estudo.

As alterações encontradas para expressão de histona-H3, no entanto, não podem ser relacionadas a muitas evidências da literatura, dado que o foco dos

estudos está nas modificações epigenéticas relacionadas às histonas, como acetilação e metilação, enquanto aqui foram quantificados os níveis de histona-H3 total. Nesse sentido, até o momento, apenas 1 trabalho encontrado na literatura destaca-se por evidenciar alterações nos níveis de histonas totais relacionadas a algum transtorno que afete o SNC. Neste estudo *post mortem* conduzido por Narayan e colaboradores (2015), foi relatado que pacientes com a doença de Alzheimer apresentavam elevados níveis de histona-H3 e H4 total e acetilada em determinadas regiões cerebrais.

Outra suposta possibilidade seria de que as alterações na expressão de DNMTs e consequentemente na metilação do DNA, poderiam, de alguma forma, regular os demais mecanismos epigenéticos existentes. Nesse sentido, evidências indicam que a metilação do DNA afeta a organização nuclear e modificações em histonas, como metilação e acetilação de histona-H3 (Gilbert *et al.*, 2007). Porém não há um consenso sobre isso, o que ocorre possivelmente porque muitos dos estudos que têm sido conduzidos utilizam abordagens genéticas com células embrionárias de camundongos *knockout* para algumas das DNMTs, muitas vezes apresentando diferentes níveis remanescentes de metilação do DNA (Gilbert *et al.*, 2007; Lande-Diner *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2003). Por outro lado, Tsumura e colaboradores (2006) utilizaram células modificadas que não apresentavam nenhuma das DNMTs e mostraram, com isso, que a perda completa da metilação do DNA não tem efeito sobre o nível de modificações em histonas, sugerindo que o efeito da metilação do DNA em outros mecanismos epigenéticos varia entre os tipos de células analisadas. De qualquer forma, entretanto, as evidências apresentadas relacionam a metilação do DNA com os efeitos sobre acetilação ou metilação em histonas e não sobre os seus níveis totais. Então, mais estudos são necessários não só para confirmar os resultados obtidos no presente trabalho, como também para compreendê-los se confirmados.

É importante considerar, ainda, que já foram identificadas e descritas diferentes isoformas, produtos de *splicing* alternativo, das enzimas DNMT3a e DNMT3b. Para DNMT3a, até o momento foram identificadas 2 isoformas, sendo que a DNMT3a2, mais recentemente descrita, possui uma atividade metiltransferase similiar à DNMT3a *in vitro* (Chen *et al.*, 2002). No entanto, DNMT3a e DNMT3a2 exibem diferentes padrões de localização subcelular: a DNMT3a parece estar concentrada

na heterocromatina e é expressa em baixos níveis em diferentes locais e células, enquanto a DNMT3a2 apresenta um padrão sugestivo de associação com a eucromatina e é predominantemente expressa em altos níveis em células-tronco embrionárias e em tecidos conhecidos por sofrerem metilação *de novo*, como testículos e ovários (Chen *et al.*, 2002).

Já com relação a DNMT3b, ao todo, 8 isoformas já foram descritas, sendo que a DNMT3b1 é a única isoforma que possui todos os éxons (Hermann *et al.*, 2004; La Salle e Trasler, 2006) e as DNMTs 3b1 e 3b2, apesar de não possuirem todos os éxons, apresentam atividade metiltransferase, ao contrário das demais (DNMT3b3 – DNMT3b8) (La Salle e Trasler, 2006; Weisenberger *et al.*, 2004). Assim, as isoformas conhecidas de DNMT3a ou DNMT3b, quando apresentam atividade catalítica, parecem ter distintos alvos para promoção da metilação do DNA, apresentando, por consequência, diferentes funções e efeitos biológicos. Ao considerar, então, que no presente estudo foram encontradas 3 "bandas" diferentes para tais proteínas analisadas por *Western Blotting* (APÊNDICE II), é possível sugerir que elas podem estar relacionadas às diferentes isoformas apresentadas pelas enzimas e, tendo isso, a comparação entre as demais bandas também pode ser interessante.

Por último, e não menos importante, destacam-se os diferentes perfis apresentados por cada estrutura encefálica analisada, tanto para metilação global do DNA, como para expressão de DNMTs, em resposta ao estresse ou tratamento com os antagonistas do receptor NMDA. Tais ensaios foram conduzidos com amostras de córtex frontal e hipocampo tendo em vista o amplo corpo de evidências que indica associação de tais estruturas com a depressão e o seu tratamento. Redução no volume e neurogênese hipocampal e cortical, por exemplo, são achados bastante comuns em pacientes deprimidos (Banasr *et al.*, 2007; MacQueen e Frodl, 2011; Price e Drevets, 2009) e, em modelos animais, diversas alterações são induzidas nestas estruturas em consequência da exposição ao estresse, como diminuição da proliferação celular (Malberg e Duman, 2003), atrofia dendrítica (Govindarajan *et al.*, 2006) e morte neuronal (Heine *et al.*, 2004). Estes, dentre outros efeitos moleculares do estresse, podem ser atenuados ou revertidos pelo tratamento com antidepressivos (Castrén e Rantamäki, 2010; Kimpton, 2012; Santarelli *et al.*, 2003).

Com relação ao hipocampo, sabe-se, ainda, que, além de modular as respostas subsequentes à exposição ao estresse, também tem um importante papel na consolidação de processos cognitivos relacionados à aprendizagem e memória espacial (Eichenbaum *et al.*, 1999; Kim e Fanselow, 1992; Moser *et al.*, 1995). Essas diferentes funções, por sua vez, parecem estar associadas de forma distinta com as porções dorsal e ventral dessa estrutura (Bannerman *et al.*, 2004; Bertoglio, Joca e Guimarães, 2006; Fanselow e Dong, 2010), de tal forma que o HD parece estar mais intimamente relacionado a processos cognitivos e sensoriais, como aprendizagem espacial e memória, enquanto o HV parece estar mais intimamente relacionado à resposta ou ao controle hormonal, motivacional e emocional ao estresse. Além disso, um trabalho recente publicado pelo nosso grupo demostrou que a via de sinalização glutamatérgica do HD e HV modula a resposta comportamental de ratos submetidos ao FST (Diniz *et al.*, 2016). Considerando estas evidências, no presente estudo, as possíveis alterações moleculares induzidas pelo estresse e pelo tratamento farmacológico foram investigadas em ambas porções do hipocampo, separadamente.

Quanto às quantificações conduzidas no CF, é importante considerar que a dissecção dessa estrutura foi realizada como um todo, desconsiderando o fato de que ela apresenta subregiões distintas em caráter anatômico e funcional, sendo usualmente dividida em: córtex orbito-frontal, córtex pré-frontal lateral e córtex pré-frontal medial (Groenewegen, 1988; Leonard, 1972; Sesack *et al.*, 1989), com o último ainda subdividido em ventral (infra-límbico e pré-límbico) e dorsal (córtex cingulado anterior) (Vertes, 2004). Dessa forma, os resultados obtidos para metilação global do DNA ou expressão de DNMTs refletem a somatória de possíveis efeitos provenientes das porções isoladas.

De fato, alguns dos resultados aqui obtidos para as diferentes estruturas cerebrais analisadas estão de acordo com evidências da literatura, como o aumento dos níveis de metilação do DNA após exposição ao estresse em algumas condições (Lee *et al.*, 2010; Murgatroyd *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2008). Contudo, tendo em vista todas as limitações e ressalvas apresentadas, estudos adicionais são necessários para verificar os reais efeitos do estresse e do tratamento com antagonistas do receptor NMDA sobre a metilação do DNA em tais estruturas, bem como verificar se estes efeitos diferem com a administração de ketamina ou MK-801,

relacionando as possíveis modificações epigenéticas com o efeito comportamental distinto apresentado por ratos submetidos ao FST após tratamento com tais drogas.

Conclusão

5. CONCLUSÀO

Os resultados apresentados no presente estudo permitem concluir que:

- Administração de antagonistas do receptor NMDA podem induzir diferentes efeitos comportamentais em animais submetidos ao FST em decorrência de variações nos protocolos conduzidos, bem como ocorre com muitas outras classes de drogas que são testadas usualmente neste modelo animal. Destaca-se a importância de referenciar nos trabalhos a maior gama de detalhes possíveis, no intuito de aumentar a reprodutibilidade dos resultados.
- A análise do efeito tipo-antidepressivo da ketamina no FST, principalmente o efeito sustentado, está sob influência de diferentes parâmetros, tais como: espécie animal utilizada, dose e preparação química do fármaco, intervalo entre o pré-teste (no caso de ratos), tratamento e teste do FST e uso de grupos independentes ou reexposição dos mesmos animais a este teste.
- Administração sistêmica aguda de S(+)-ketamina 10 mg/Kg ou MK-801 0,025 mg/Kg, em ratos, 23 horas após a sessão pré-teste do FST e 1 hora ou 7 dias antes da sessão teste do mesmo, permite a análise de um efeito tipo-antidepressivo rápido e sustentado induzido pela ketamina e apenas rápido pelo MK-801.
- O estresse do pré-teste do FST e o tratamento com antagonistas do receptor NMDA, ketamina e MK-801, modulam a metilação global do DNA e expressão de DNMT3 em estruturas encefálicas relacionadas ao controle da resposta emocional, como o córtex frontal, hipocampo ventral e hipocampo dorsal, No entanto, os efeitos observados foram discretos, devido à variabilidade dos dados, tornando necessário a realização de experimentos adicionais para melhor esclarecimento quanto à participação da metilação do DNA sobre os efeitos rápidos e sustentados da ketamina.

Referências

6. REFERÊNCIAS

ALDRIDGE, G. M. *et al.* The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, n. 2, p. 250–254, 2008.

ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 51, p. 786–94, maio 1964.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. [s.l.] American Psychiatric Association, 2013.

ARONI, F. *et al.* Pharmacological aspects and potential new clinical applications of ketamine: reevaluation of an old drug. **Journal of clinical pharmacology**, v. 49, n. 8, p. 957–64, ago. 2009.

AUTRY, A. E. *et al.* NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 91–95, 15 jun. 2011.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 2, p. 238–58, abr. 2012.

AXELROD, J.; INSCOE, J. K. THE UPTAKE AND BINDING OF CIRCULATING SEROTONIN AND THE EFFECT OF DRUGS. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 161–5, ago. 1963.

AZIMA, H.; VISPO, R. H. IMIPRAMINE: A POTENT NEW ANTI-DEPRESSANT COMPOUND. **http://dx.doi.org/10.1176/ajp.115.3.245**, 2006.

BANASR, M. *et al.* Chronic Unpredictable Stress Decreases Cell Proliferation in the Cerebral Cortex of the Adult Rat. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 496–504, 2007.

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

BÁRTOVÁ, E. *et al.* Histone modifications and nuclear architecture: a review. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 56, n. 8, p. 711–21, ago. 2008.

BAYLIN, S. B. *et al.* Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and

gene expression in cancer. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 7, p. 687–92, abr. 2001.

BECHTHOLT-GOMPF, A. J. *et al.* CD-1 and Balb/cJ mice do not show enduring antidepressant-like effects of ketamine in tests of acute antidepressant efficacy. **Psychopharmacology**, v. 215, n. 4, p. 689–95, jun. 2011.

BEGLEY, C. G.; IOANNIDIS, J. P. A. Reproducibility in science: improving the standard for basic and preclinical research. **Circulation research**, v. 116, n. 1, p. 116–26, 2 jan. 2015.

BERMAN, R. M. *et al.* **Antidepressant effects of ketamine in depressed patientsBiological Psychiatry**. [s.l: s.n.].

BERTOGLIO, L. J.; JOCA, S. R. L.; GUIMARÃES, F. S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within the hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 183–188, 2006.

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

BEUREL, E. Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 4, p. 18, 2011.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & development**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 1 jan. 2002.

BOGDANOVA, O. V. *et al.* Factors influencing behavior in the forced swim test. **Physiology & Behavior**, v. 118, p. 227–239, 2013.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 147–60, 1988.

BOULLE, F. *et al.* Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. **Molecular psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 584–96, jun. 2012.

BOYES, J.; BIRD, A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. **The EMBO journal**, v. 11, n. 1, p. 327–33, jan. 1992.

BREDY, T. W. *et al.* Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 14, n. 4, p. 268–76, abr. 2007.

BRILEY, M.; LÉPINE. The increasing burden of depression. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. Volume 7, n. Supplement 1, p. 3, maio 2011.

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

BURGDORF, J. *et al.* GLYX-13, a NMDA Receptor Glycine-Site Functional Partial Agonist, Induces Antidepressant-Like Effects Without Ketamine-Like Side Effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 5, p. 729–742, 5 abr. 2013.

CARRASCO, G. A.; KAR, L. D. VAN DE. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 235–272, 2003.

CASPI, A. *et al.* Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5631, p. 386–9, 18 jul. 2003.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; PORSOLT, R. D. **Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents**. [s.l.] CRC Press/Taylor & Francis, 2009.

CASTRÉN, E. Is mood chemistry? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 3, p. 241–6, mar. 2005.

CASTRÉN, E.; RANTAMÄKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. **Developmental Neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 289–297, abr. 2010.

CHAMPAGNE, F. A. *et al.* Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359–371, 2003.

CHEN, J. *et al.* Maternal deprivation in rats is associated with corticotrophin-releasing hormone (CRH) promoter hypomethylation and enhances CRH transcriptional responses to stress in adulthood. **Journal of neuroendocrinology**, v. 24, n. 7, p. 1055–64, jul. 2012.

CHEN, T. *et al.* A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active de novo methylation. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38746–54, 11 out. 2002.

CHOI, M. *et al.* Ketamine produces antidepressant-like effects through phosphorylation-dependent nuclear export of histone deacetylase 5 (HDAC5) in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 112, n. 51, p. 15755–60, 22 dez. 2015.

COPPEN, A. *et al.* Abnormalities of Indoleamines in Affective Disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 26, n. 5, p. 474, 1 maio 1972.

COUTINHO, V.; KNÖPFEL, T. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 8, n. 6, p. 551–61, dez. 2002.

COVINGTON, H. E. *et al.* Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 37, p. 11451–60, 16 set. 2009.

CRUCEANU, C. *et al.* H3K4 tri-methylation in synapsin genes leads to different expression patterns in bipolar disorder and major depression. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 16, n. 2, p. 289–99, mar. 2013.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–245, 2002.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. Animal models of mood disorders: recent developments. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 1–7, jan. 2007.

DELGADO, P. L. *et al.* Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. **Archives of general psychiatry**, v. 47, n. 5, p. 411–8, maio 1990.

DELL'AVERSANA, C.; LEPORE, I.; ALTUCCI, L. HDAC modulation and cell death in the clinic. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 11, p. 1229–1244, 2012.

DENK, M. C. *et al.* Monitoring ketamine treatment response in a depressed patient via peripheral mammalian target of rapamycin activation. **The American journal of psychiatry**, v. 168, n. 7, p. 751–2, jul. 2011.

DEVLIN, A. M. *et al.* Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e12201, 2010.

DIAZGRANADOS, N. *et al.* A randomized add-on trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant bipolar depression. **Archives of general psychiatry**, v. 67, n. 8, p. 793–802, ago. 2010.

DILLON, P.; COPELAND, J.; JANSEN, K. Patterns of use and harms associated with non-medical ketamine use. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 69, n. 1, p. 23–28, 2003.

DINIZ, C. R. A. F.; CASAROTTO, P. C.; JOCA, S. R. L. NMDA-NO signaling in the dorsal and ventral hippocampus time-dependently modulates the behavioral responses to forced swimming stress. **Behavioural Brain Research**, v. 307, p. 126–136, 2016.

DOMINO, E. F. Taming the ketamine tiger. 1965. **Anesthesiology**, v. 113, n. 3, p. 678–84, set. 2010.

DOMINO, E. F.; CHODOFF, P.; CORSSEN, G. PHARMACOLOGIC EFFECTS OF CI-581, A NEW DISSOCIATIVE ANESTHETIC, IN MAN. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 6, p. 279–91, 1965.

DONG, X.; WANG, Y.; QIN, Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 4, p. 379–87, abr. 2009.

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

DUMAN, R. S.; AGHAJANIAN, G. K. Neurobiology of rapid acting antidepressants: role of BDNF and GSK-3β. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 1, p. 233, jan. 2014.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006.

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

ECKHARDT, F. *et al.* DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature genetics**, v. 38, n. 12, p. 1378–85, dez. 2006.

EGGER, G. *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457–463, 27 maio 2004.

EICHENBAUM, H. *et al.* The Hippocampus, Memory, and Place Cells: Is It Spatial Memory or a Memory Space? **Neuron**, v. 23, n. 2, p. 209–226, 1999.

ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. **http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra072067**, 2009.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.

FOSSION, P. *et al.* Depression, anxiety and loss of resilience after multiple traumas: an illustration of a mediated moderation model of sensitization in a group of children who survived the Nazi Holocaust. **Journal of Affective Disorders**, v. 151, n. 3, p. 973–979, 2013.

FUCHIKAMI, M. *et al.* Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 12, n. 1, p. 73–82, fev. 2009.

GALLAGHER, P.; REID, K. S.; FERRIER, I. N. Neuropsychological functioning in health and mood disorder: Modulation by glucocorticoids and their receptors. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. S196–S207, 2009.

GARCIA, L. S. B. *et al.* Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 140–144, 2008.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG Islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, n. 2, p. 261–282, 1987.

GIGLIUCCI, V. *et al.* Ketamine elicits sustained antidepressant-like activity via a serotonin-dependent mechanism. **Psychopharmacology**, v. 228, n. 1, p. 157–66, jul. 2013.

GILBERT, N. *et al.* DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compaction. **The Journal of cell biology**, v. 177, n. 3, p. 401–11, 7 maio 2007.

GILDA, J. E.; GOMES, A. V. **Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β-actin for Western blotsAnalytical Biochemistry**. [s.l: s.n.].

GLOWINSKI, J.; AXELROD, J. INHIBITION OF UPTAKE OF TRITIATED-NORADRENALINE IN THE INTACT RAT BRAIN BY IMIPRAMINE AND STRUCTURALLY RELATED COMPOUNDS. **Nature**, v. 204, p. 1318–9, 26 dez. 1964.

GOVINDARAJAN, A. *et al.* Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 35, p. 13208–13, 29 ago. 2006.

GREEN, S. M.; KRAUSS, B. The semantics of ketamine. **Annals of Emergency Medicine**, v. 36, n. 5, p. 480–482, 2000.

GREENBERG, P. E. *et al.* The economic burden of depression in 1990. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 54, n. 11, p. 405–18, nov. 1993.

GREER, S. *et al.* **Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cellsJournal of Immunological Methods**. [s.l: s.n.].

GROENEWEGEN, H. J. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. **Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 379–431, fev. 1988.

HARMER, C. J. *et al.* Antidepressant Drug Treatment Modifies the Neural Processing of Nonconscious Threat Cues. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 9, p. 816–820, 2006.

HARROD, S. .; FLINT, R. .; RICCIO, D. . MK-801 induced retrieval, but not acquisition, deficits for passive avoidance conditioning. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 69, n. 3, p. 585–593, 2001.

HASHIMOTO, K. *et al.* Increased Levels of Glutamate in Brains from Patients with Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1310–1316, dez. 2007.

___. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. **Brain Research Reviews**, v. 61, n. 2, p. 105–123, 2009.

HEINE, V. M. *et al.* Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. **The European journal of neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 131–44, jan. 2004.

HENDRICH, B.; BIRD, A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 249, p. 55–74, 2000.

HENINGER, G. R.; DELGADO, P. L.; CHARNEY, D. S. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. **Pharmacopsychiatry**, v. 29, n. 1, p. 2–11, jan. 1996.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the

hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78–84, 1997.

HERMANN, A.; GOYAL, R.; JELTSCH, A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 46, p. 48350–9, 12 nov. 2004.

HIROTA, K.; LAMBERT, D. G. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. **British journal of anaesthesia**, v. 77, n. 4, p. 441–4, out. 1996.

___. Ketamine: new uses for an old drug? **British journal of anaesthesia**, v. 107, n. 2, p. 123–6, ago. 2011.

HOLLIDAY, R. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76–80, 2006.

HOLMANS, P. *et al.* Genetics of Recurrent Early-Onset Major Depression (GenRED): Final Genome Scan Report. **Am J Psychiatry**, v. 164, n. 2, 2007.

HOLSBOER, F. *et al.* Altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. **Neuroendocrinology**, v. 62, n. 4, p. 340–7, out. 1995.

___. The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 5, p. 477–501, nov. 2000.

HOMAYOUN, H.; MOGHADDAM, B. NMDA Receptor Hypofunction Produces Opposite Effects on Prefrontal Cortex Interneurons and Pyramidal Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 43, p. 11496–11500, 24 out. 2007.

HORARD, B. *et al.* Global analysis of DNA methylation and transcription of human repetitive sequences. **Epigenetics**, v. 4, n. 5, p. 339–50, 1 jul. 2009.

HUIDOBRO, C.; FERNANDEZ, A. F.; FRAGA, M. F. Aging epigenetics: Causes and consequences. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 4, p. 765–781, 2013.

HUNSBERGER, J. G. *et al.* Cellular mechanisms underlying affective resiliency: The role of glucocorticoid receptor- and mitochondrially-mediated plasticity. **Brain Research**, v. 1293, p. 76–84, 2009.

HUNT, M. J.; RAYNAUD, B.; GARCIA, R. Ketamine Dose-Dependently Induces High-Frequency Oscillations in the Nucleus Accumbens in Freely Moving Rats. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 11, p. 1206–1214, 2006.

IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annual review of pathology**, v. 4, p. 229–49, 2009.

IGA, J. *et al.* Altered HDAC5 and CREB mRNA expressions in the peripheral leukocytes of major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 628–632, 2007.

JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrine reviews**, v. 12, n. 2, p. 118–34, maio 1991.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3s, p. 245–254, mar. 2003.

JAMORA, C.; IRAVANI, M. Unique clinical situations in pediatric patients where ketamine may be the anesthetic agent of choice. **American journal of therapeutics**, v. 17, n. 5, p. 511–5, 2010.

JANKORD, R.; HERMAN, J. P. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 64–73, dez. 2008.

JANSEN, K. L.; DARRACOT-CANKOVIC, R. The nonmedical use of ketamine, part two: A review of problem use and dependence. **Journal of psychoactive drugs**, v. 33, n. 2, p. 151–8, 2001.

JELTSCH, A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 301, p. 203–25, 2006.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 459, 2 abr. 2009.

JURUENA, M. F. *et al.* Different responses to dexamethasone and prednisolone in the same depressed patients. **Psychopharmacology**, v. 189, n. 2, p. 225–235, 3 nov. 2006.

KANAI, H. *et al.* Valproic acid inhibits histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation and apoptotic death in neurons. **The pharmacogenomics journal**, v. 4, n. 5, p. 336–44, 2004.

KATON, W. J. Clinical and health services relationships between major depression, depressive symptoms, and general medical illness. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 216–226, 2003.

KENDLER, K. S.; THORNTON, L. M.; GARDNER, C. O. Genetic Risk, Number of Previous Depressive Episodes, and Stressful Life Events in Predicting Onset of Major Depression. **Am J Psychiatry**, v. 1584, 2001.

KENNEDY, S. H.; GORWOOD, P. **Successful Management of Major Depressive Disorder**. Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Evolving Medicine Ltd, 2013.

KESSLER, R. C. THE EFFECTS OF STRESSFUL LIFE EVENTS ON DEPRESSION. **Annu. Rev. Psychol**, v. 48, p. 191–214, 1997.

KEVERNE, E. B. Significance of epigenetics for understanding brain development, brain evolution and behaviour. **Neuroscience**, v. 264, p. 207–217, 2014.

KHEIRBEK, M. A.; HEN, R. Dorsal vs Ventral Hippocampal Neurogenesis: Implications for Cognition and Mood. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 373–374, jan. 2011.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science (New York, N.Y.)**, v. 256, n. 5057, p. 675–7, 1 maio 1992.

KIM, J. K.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 66, n. 4, p. 596–612, fev. 2009.

KIMPTON, J. The brain derived neurotrophic factor and influences of stress in depression. **Psychiatria Danubina**, v. 24 Suppl 1, p. S169–71, set. 2012.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 2, p. 89–97, 2006.

KOCERHA, J. *et al.* MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 3507–12, 3 mar. 2009.

KOENIGS, M. *et al.* Distinct Regions of Prefrontal Cortex Mediate Resistance and Vulnerability to Depression. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 47, p. 12341–12348, 19 nov. 2008.

KOHRS, R.; DURIEUX, M. E. Ketamine: teaching an old drug new tricks. **Anesthesia and analgesia**, v. 87, n. 5, p. 1186–93, nov. 1998.

KOIKE, H.; IIJIMA, M.; CHAKI, S. Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 224, n. 1, p. 107–111, 2011.

KORNBERG, M. D. *et al.* GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. **Nature cell biology**, v. 12, n. 11, p. 1094–100, nov. 2010.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 171, n. 2, p. 157–191, 15 jan. 1977.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 16 out. 2008.

KUGAYA, A.; SANACORA, G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. **CNS spectrums**, v. 10, n. 10, p. 808–19, out. 2005.

KUHN, R. [Treatment of depressive states with an iminodibenzyl derivative (G 22355)]. **Schweizerische medizinische Wochenschrift**, v. 87, n. 35-36, p. 1135–40, 31 ago. 1957.

KULKARNI, S. K.; DHIR, A. Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 6, p. 1248–1254, 2007.

LANDE-DINER, L. *et al.* Role of DNA methylation in stable gene repression. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 16, p. 12194–200, 20 abr. 2007.

LAPLANT, Q. *et al.* Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 1137–43, set. 2010.

LARSEN, F. *et al.* CpG islands as gene markers in the human genome. **Genomics**, v. 13, n. 4, p. 1095–107, ago. 1992.

LEE, H.-G. *et al.* State-of-the-art housekeeping proteins for quantitative western blotting: Revisiting the first draft of the human proteome. **Proteomics**, v. 16, n. 13, p. 1863–7, jul. 2016.

LEE, R. S. *et al.* Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4332–43, set. 2010.

LEE, S. H. *et al.* Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. **Nature Genetics**, v. 45, n. 9, p. 984–994, 11 ago. 2013.

LEONARD, C. M. The connections of the dorsomedial nuclei. **Brain, behavior and evolution**, v. 6, n. 1, p. 524–41, 1972.

LEONARDO, E. D. *et al.* Molecular heterogeneity along the dorsal–ventral axis of the

murine hippocampal CA1 field: a microarray analysis of gene expression. **Neuroscience**, v. 137, n. 1, p. 177–186, 2006.

LÉVEILLÉ, F. *et al.* Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, n. 12, p. 4258–71, dez. 2008.

LI, N. *et al.* mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science (New York, N.Y.)**, v. 329, n. 5994, p. 959–64, 20 ago. 2010.

___. Glutamate N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists Rapidly Reverse Behavioral and Synaptic Deficits Caused by Chronic Stress Exposure. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754–761, 2011.

LI, R.; SHEN, Y. An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. **Life sciences**, v. 92, n. 13, p. 747–51, 19 abr. 2013.

LI, Y.-F. *et al.* Inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor function appears to be one of the common actions for antidepressants. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 20, n. 5, p. 629–35, set. 2006.

LINDHOLM, J. S. O. *et al.* The antidepressant-like effects of glutamatergic drugs ketamine and AMPA receptor potentiator LY 451646 are preserved in bdnf+/− heterozygous null mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 391–397, 2012.

LIU, R.-J. *et al.* GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold doses of ketamine. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2268–77, out. 2013.

LIU, R.-J.; AGHAJANIAN, G. K. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: Role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 1, p. 359–364, 8 jan. 2008.

LIVIA CHIRIŢĂ, A. *et al.* Current understanding of the neurobiology of major depressive disorder. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 2, p. 651–658, 2015.

LOOMER, H. P.; SAUNDERS, J. C.; KLINE, N. S. A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. **Psychiatric research reports**, v. 8, p. 129–41, dez. 1957.

LÓPEZ-FIGUEROA, M. .; ITOI, K.; WATSON, S. . Regulation of nitric oxide synthase messenger RNA expression in the rat hippocampus by glucocorticoids. **Neuroscience**, v. 87, n. 2, p. 439–446, 1998.

LÓPEZ, J. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. ROLE OF BIOLOGICAL AND PSYCHOLOGICAL FACTORS IN EARLY DEVELOPMENT AND THEIR IMPACT ON ADULT LIFE Neural Circuits Mediating Stress. **Biol Psychiatry**, v. 46, p. 1461–1471, 1999.

LÖSCHER, W.; ANNIES, R.; HÖNACK, D. The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 induces increases in dopamine and serotonin metabolism in several brain regions of rats. **Neuroscience letters**, v. 128, n. 2, p. 191–4, 22 jul. 1991.

LOWE, D. A. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase varies with age in glycolytic muscles of rats. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 55, n. 3, p. B160–4, mar. 2000.

MA, X.-C. *et al.* Long-lasting antidepressant action of ketamine, but not glycogen synthase kinase-3 inhibitor SB216763, in the chronic mild stress model of mice. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56053, 2013.

MA, Y. *et al.* DNA CpG hypomethylation induces heterochromatin reorganization involving the histone variant macroH2A. **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 8, p. 1607–16, 15 abr. 2005.

MAĆKOWIAK, M. *et al.* MK-801, a NMDA receptor antagonist, increases phosphorylation of histone H3 in the rat medial prefrontal cortex. **Pharmacological reports : PR**, v. 65, n. 5, p. 1112–23, 2013.

MACQUEEN, G.; FRODL, T. The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 3, p. 252–264, 27 mar. 2011.

MAENG, S. *et al.* Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of α-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 349–352, fev. 2008.

MAENG, S.; ZARATE, C. A. The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. **Current psychiatry reports**, v. 9, n. 6, p. 467–74, dez. 2007.

MAES, M. *et al.* Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation

by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsivity. **Acta psychiatrica Scandinavica**, v. 97, n. 4, p. 302–8, abr. 1998.

MALBERG, J. E.; DUMAN, R. S. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 9, p. 1562–71, set. 2003.

MARTIN, J.-L.; FINSTERWALD, C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development. **Communicative & integrative biology**, v. 4, n. 1, p. 14–6, jan. 2011.

MATHEWS, D. C.; HENTER, I. D.; ZARATE, C. A. Targeting the Glutamatergic System to Treat Major Depressive Disorder. **Drugs**, v. 72, n. 10, p. 1313–1333, jul. 2012.

MATRISCIANO, F. *et al.* Activation of group II metabotropic glutamate receptors promotes DNA demethylation in the mouse brain. **Molecular pharmacology**, v. 80, n. 1, p. 174–82, jul. 2011.

MATTSON, M. P.; GLEICHMANN, M.; CHENG, A. Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders. **Neuron**, v. 60, n. 5, p. 748–766, 2008.

MAYBERG, H. S. Positron emission tomography imaging in depression: a neural systems perspective. **Neuroimaging clinics of North America**, v. 13, n. 4, p. 805–15, nov. 2003.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. 2006.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiological reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, jul. 2007.

MCGOWAN, P. O. *et al.* Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 3, p. 342–8, mar. 2009.

MCGOWAN, P. O.; KATO, T. Epigenetics in mood disorders. **Environmental health and preventive medicine**, v. 13, n. 1, p. 16–24, jan. 2008.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S–15S, abr. 2000.

MILLER, C. A.; SWEATT, J. D. Covalent Modification of DNA Regulates Memory

Formation. **Neuron**, v. 53, n. 6, p. 857–869, 2007.

MIZUNO, K. *et al.* Long-lasting regulation of hippocampal Bdnf gene transcription after contextual fear conditioning. **Genes, brain, and behavior**, v. 11, n. 6, p. 651–9, ago. 2012.

MOGHADDAM, B. Stress Preferentially Increases Extraneuronal Levels of Excitatory Amino Acids in the Prefrontal Cortex: Comparison to Hippocampus and Basal Ganglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 5, p. 1650–1657, maio 1993.

___. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 10, p. 775–787, 2002.

MOOSAVI, M. *et al.* The effect of sub-anesthetic and anesthetic ketamine on water maze memory acquisition, consolidation and retrieval. **European Journal of Pharmacology**, v. 677, n. 1, p. 107–110, 2012.

MORILAK, D. A.; FRAZER, A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 7, n. 2, p. 193–218, jun. 2004.

MOSER, M. B. *et al.* Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 21, p. 9697–701, 10 out. 1995.

MULLIGAN, C. J. *et al.* Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. **Epigenetics**, v. 7, n. 8, p. 853–7, ago. 2012.

MURGATROYD, C. *et al.* Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 1559–66, dez. 2009.

MURROUGH, J. W. *et al.* Rapid and Longer-Term Antidepressant Effects of Repeated Ketamine Infusions in Treatment-Resistant Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 250–256, 2013.

NANNEY, D. L. EPIGENETIC CONTROL SYSTEMS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 44, n. 7, p. 712–7, 15 jul. 1958.

NARAYAN, P. J. *et al.* Increased acetyl and total histone levels in post-mortem Alzheimer's disease brain. **Neurobiology of Disease**, v. 74, p. 281–294, 2015.

NASCA, C. *et al.* L-acetylcarnitine causes rapid antidepressant effects through the epigenetic induction of mGlu2 receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 12, p. 4804–9, 19 mar. 2013.

NELSON, E. D.; KAVALALI, E. T.; MONTEGGIA, L. M. Activity-Dependent Suppression of Miniature Neurotransmission through the Regulation of DNA Methylation. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 395–406, 9 jan. 2008.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **Journal of Psychiatric Research**, v. 41, n. 3, p. 189–206, 2007.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. Supp, p. 1068–1070, nov. 2002.

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

NESTLER, E. J. *et al.* Epigenetic Basis of Mental Illness. **The Neuroscientist**, p. 1073858415608147, 8 out. 2015.

NICKEL, T. *et al.* Clinical and neurobiological effects of tianeptine and paroxetine in major depression. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 23, n. 2, p. 155–68, abr. 2003.

NIKISCH, G. *et al.* Long-term citalopram administration reduces responsiveness of HPA axis in patients with major depression: relationship with S-citalopram concentrations in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) and clinical response. **Psychopharmacology**, v. 181, n. 4, p. 751–60, out. 2005.

O'CONNOR, R. M. *et al.* microRNAs as novel antidepressant targets: converging effects of ketamine and electroconvulsive shock therapy in the rat hippocampus. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 16, n. 8, p. 1885–92, set. 2013.

O'NEIL, M. F.; MOORE, N. A. Animal models of depression: are there any? **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 18, n. 4, p. 239–254, jun. 2003.

OAKES, C. C. *et al.* A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 1, p. 228–33, 2 jan. 2007.

OBERLANDER, T. F. *et al.* Prenatal exposure to maternal depression, neonatal

methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. **Epigenetics**, v. 3, n. 2, p. 97–106, 2008.

ORREGO, F.; VILLANUEVA, S. **The chemical nature of the main central excitatory transmitter: A critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localizationNeuroscience**, 1993.

OVERMIER, J. B.; SELIGMAN, M. E. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 63, n. 1, p. 28–33, fev. 1967.

PABLO, J. M. DE *et al.* Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. **Physiology & Behavior**, v. 46, n. 2, p. 229–237, 1989.

PANDIS, C. *et al.* Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. **Neuroscience**, v. 140, n. 1, p. 163–175, 2006.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 383–400, jun. 2013.

PARIANTE, C. M. Risk Factors for Development of Depression and Psychosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1179, n. 1, p. 144–152, out. 2009.

PAUL, I. A.; SKOLNICK, P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1003, p. 250–72, nov. 2003.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 3, p. 245–55, jan. 2005.

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

PFENNINGER, E. G.; DURIEUX, M. E.; HIMMELSEHER, S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers. **Anesthesiology**, v. 96, n. 2, p. 357–66, fev. 2002.

PHILIBERT, R. A. *et al.* The relationship of 5HTT (SLC6A4) methylation and genotype on mRNA expression and liability to major depression and alcohol dependence in subjects from the Iowa Adoption Studies. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 147B, n. 5, p. 543–9, 5 jul.

2008.

POPIK, P. *et al.* Lack of persistent effects of ketamine in rodent models of depression. **Psychopharmacology**, v. 198, n. 3, p. 421–30, jun. 2008.

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

PORSOLT, R. D. *et al.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European journal of pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–91, 15 fev. 1978.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 229, n. 2, p. 327–36, out. 1977.

PORSOLT, R. D.; PICHON, M. LE; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–2, 21 abr. 1977.

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **The American journal of psychiatry**, v. 149, n. 8, p. 999–1010, ago. 1992.

POULTER, M. O. *et al.* GABAA Receptor Promoter Hypermethylation in Suicide Brain: Implications for the Involvement of Epigenetic Processes. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 8, p. 645–652, 2008.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neurocircuitry of Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 10, p. 192–216, 2009.

RADTKE, K. M. *et al.* Transgenerational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. **Translational psychiatry**, v. 1, p. e21, 2011.

RÉUS, G. Z. *et al.* Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 1, p. 166–171, 2011.

___. Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. **Behavioural Brain Research**, v. 256, p. 451–456, 2013.

RIPKE, S. *et al.* A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 4, p. 497–511, 3 abr. 2013.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 174, n. 3, p. 341–8, 31 jan. 2006.

ROSENZWEIG-LIPSON, S. *et al.* Differentiating antidepressants of the future: Efficacy and safety. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 134–153, 2007.

ROTH, T. L. *et al.* Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 45, n. 7, p. 919–926, 2011.

SAARELAINEN, T. *et al.* Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 349–57, 1 jan. 2003.

SAID, H. M. *et al.* Absence of GAPDH regulation in tumor-cells of different origin under hypoxic conditions in - vitro. **BMC research notes**, v. 2, p. 8, 2009.

SALES, A. J. *et al.* Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 6, p. 1711–21, nov. 2011.

SALES, A. J.; JOCA, S. R. L. Effects of DNA methylation inhibitors and conventional antidepressants on mice behaviour and brain DNA methylation levels. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 28, n. 01, p. 11–22, 26 fev. 2016.

SALLE, S. LA; TRASLER, J. M. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. **Developmental Biology**, v. 296, n. 1, p. 71–82, 2006.

SANACORA, G. *et al.* Clinical studies implementing glutamate neurotransmission in mood disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1003, p. 292–308, nov. 2003.

___. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. **Archives of general psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 705–13, jul. 2004.

___. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 7, n. 5, p. 426–37, maio 2008.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: An emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 63–77, 2012.

SANTARELLI, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5634, p. 805–9, 8 ago. 2003.

SAWA, A. *et al.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11669–74, 14 out. 1997.

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic amines and emotion. **Science (New York, N.Y.)**, v. 156, n. 3771, p. 21–37, 7 abr. 1967.

SCHMID, D. A. *et al.* Changes of sleep architecture, spectral composition of sleep EEG, the nocturnal secretion of cortisol, ACTH, GH, prolactin, melatonin, ghrelin, and leptin, and the DEX-CRH test in depressed patients during treatment with mirtazapine. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 4, p. 832–44, abr. 2006.

SCHÜLE, C. *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenocortical system dysregulation and new treatment strategies in depression. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 9, n. 7, p. 1005–19, jul. 2009.

SCHWABE, L. *et al.* Stress effects on memory: An update and integration. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1740–1749, 2012.

SELIGMAN, M. E.; BEAGLEY, G. Learned helplessness in the rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 88, n. 2, p. 534–41, fev. 1975.

SELIKOFF, I. J. *et al.* TREATMENT OF PULMONARY TUBERCULOSIS WITH HYDRAZIDE DERIVATIVES OF ISONICOTINIC ACID. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 150, n. 10, p. 973, 8 nov. 1952.

SESACK, S. R. *et al.* Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **The Journal of comparative neurology**, v. 290, n. 2, p. 213–42, 8 dez. 1989.

SHANSKY, R. M.; MORRISON, J. H. Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: Effects of circuit, hormones and rest. **Brain Research**, v. 1293, p. 108–113, 2009.

SHELINE, Y. I. *et al.* Hippocampal atrophy in recurrent major depression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 3908–13, 30 abr. 1996.

SHELINE, Y. I.; GADO, M. H.; KRAEMER, H. C. Untreated Depression and Hippocampal Volume Loss. **http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.160.8.1516**, 2003.

SHERMAN, A. D. *et al.* A neuropharmacologically-relevant animal model of depression. **Neuropharmacology**, v. 18, n. 11, p. 891–3, nov. 1979.

SHORS, T. J. *et al.* Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 244, n. 4901, p. 224–6, 14 abr. 1989.

SIKAND, K. *et al.* Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β-actin are targets of miR-644a. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47510, 2012.

SIMON, G. E. Social and economic burden of mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 208–215, 2003.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **European journal of pharmacology**, v. 375, n. 1-3, p. 31–40, 30 jun. 1999.

SKOLNICK, P. Modulation of glutamate receptors: Strategies for the development of novel antidepressants. **Amino Acids**, v. 23, n. 1-3, p. 153–159, 1 set. 2002.

SKOLNICK, P.; POPIK, P.; TRULLAS, R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 11, p. 563–569, 2009.

SLACK, J. M. W. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 11, p. 889–895, nov. 2002.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 3 maio 2012.

SPINHOVEN, P. *et al.* The specificity of childhood adversities and negative life events across the life span to anxiety and depressive disorders. **Journal of affective disorders**, v. 126, n. 1-2, p. 103–12, out. 2010.

STAAY, F. J. VAN DER. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Research Reviews**, v. 52, n. 1, p. 131–159, 2006.

STEIN, R.; RAZIN, A.; CEDAR, H. In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 11, p. 3418–22, jun. 1982.

STEPHENSON, F. A. Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. **Biochemical Society transactions**, v. 34, n. Pt 5, p. 877–81, nov. 2006.

STERRENBURG, L. *et al.* Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e28128, 2011.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–5, 6 jan. 2000.

SU, J. *et al.* Test-retest paradigm of the forced swimming test in female mice is not valid for predicting antidepressant-like activity: participation of acetylcholine and sigma-1 receptors. **Journal of pharmacological sciences**, v. 123, n. 3, p. 246–55, 2013.

SULLIVAN, P. F.; MICHAEL NEALE, F. C.; KENDLER, K. S. Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 10, 2000.

SUZUKI, M. M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics, Published online: 01 June 2008; | doi:10.1038/nrg2341**, v. 9, n. 6, p. 465, 2008.

SZYF, M.; WEAVER, I.; MEANEY, M. Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 9–19, 2007.

TANTI, A.; BELZUNG, C. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: Are depression and the action of antidepressants region-specific? **Neuroscience**, v. 252, p. 234–252, 2013.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Negative results: negative perceptions limit their potential for increasing reproducibility. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 14, p. 12, 2015.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; DOBRÁNSZKI, J. Problems with traditional science publishing and finding a wider niche for post-publication peer review. **Accountability in research**, v. 22, n. 1, p. 22–40, 2015.

THACKER, J. S. *et al.* **Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting?Analytical Biochemistry**. [s.l: s.n.].

TIERNEY, J. G. Treatment-resistant depression: managed care considerations. **Journal of managed care pharmacy : JMCP**, v. 13, n. 6 Suppl A, p. S2–7, jul. 2007.

TIZABI, Y. *et al.* Antidepressant-like effects of low ketamine dose is associated with increased hippocampal AMPA/NMDA receptor density ratio in female Wistar–Kyoto rats. **Neuroscience**, v. 213, p. 72–80, 2012.

TOLEDO-RODRIGUEZ, M. *et al.* Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 153B, n. 7, p. 1350–4, 5 out. 2010.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **European Journal of Pharmacology**, v. 185, n. 1, p. 1–10, ago. 1990.

TSANKOVA, N. *et al.* Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 355–367, maio 2007.

TSANKOVA, N. M. *et al.* Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 519–25, abr. 2006.

TSUMURA, A. *et al.* Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 11, n. 7, p. 805–14, jul. 2006.

TUREK-PLEWA, J.; JAGODZIŃSKI, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. **Cellular & molecular biology letters**, v. 10, n. 4, p. 631–47, 2005.

UCHIDA, S. *et al.* Epigenetic Status of Gdnf in the Ventral Striatum Determines Susceptibility and Adaptation to Daily Stressful Events. **Neuron**, v. 69, n. 2, p. 359–372, 2011.

VERKHRATSKY, A.; KIRCHHOFF, F. Glutamate-mediated neuronal-glial transmission. **Journal of anatomy**, v. 210, n. 6, p. 651–60, jun. 2007.

VERTES, R. P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 51, n. 1, p. 32–58, jan. 2004.

WADE, P. A. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental**

biology, v. 23, n. 12, p. 1131–7, dez. 2001.

WANG, X. *et al.* Propofol pretreatment increases antidepressant-like effects induced by acute administration of ketamine in rats receiving forced swimming test. **Psychiatry Research**, v. 185, n. 1, p. 248–253, 2011.

WANG, Y.; LEUNG, F. C. C. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 7, p. 1170–7, 1 maio 2004.

WEAVER, I. C. G. *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847–54, ago. 2004.

WEISENBERGER, D. J. *et al.* Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. **Molecular cancer research : MCR**, v. 2, n. 1, p. 62–72, jan. 2004.

WEST, A. P. Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 14, n. 6, p. 863–77, 1990.

WEST, A. P. Neurobehavioral studies of forced swimming: The role of learning and memory in the forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 14, n. 6, p. 863–IN4, 1990.

WILKINSON, M. B. *et al.* Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 24, p. 7820–32, 17 jun. 2009.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1–16, 1984.

WONG, M.-L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 343–351, maio 2001.

WURTMAN, R. J. Genes, stress, and depression. **Metabolism**, v. 54, n. 5, p. 16–19, 2005.

YAN, Q. *et al.* Lsh, a modulator of CpG methylation, is crucial for normal histone methylation. **The EMBO journal**, v. 22, n. 19, p. 5154–62, 1 out. 2003.

YANG, X. *et al.* MicroRNA expression profile and functional analysis reveal that miR-206 is a critical novel gene for the expression of BDNF induced by ketamine. **Neuromolecular medicine**, v. 16, n. 3, p. 594–605, set. 2014.

YILMAZ, A. *et al.* Prolonged effect of an anesthetic dose of ketamine on behavioral despair. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 71, n. 1, p. 341–344, 2002.

ZARATE, C. A. *et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives of general psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856–64, ago. 2006.

ZELLER, E. A.; BARSKY, J. In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-Isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 81, n. 2, p. 459–61, nov. 1952.

ZHANG, J.; LI, S.; HASHIMOTO, K. R (−)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than S (+)-ketamine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 116, p. 137–141, 2014.

ZIMMERMANN, N. *et al.* Antidepressants inhibit DNA methyltransferase 1 through reducing G9a levels. **The Biochemical journal**, v. 448, n. 1, p. 93–102, 15 nov. 2012.

Apêndices

APÊNDICE I: Análise da eficiência da extração de proteínas nucleares e citosólicas.

Figura 18. Imagem representativa do *Western Blotting* realizado para avaliar a eficiência da técnica de extração de proteínas nucleares e citosólicas. A análise foi conduzida aplicando ao gel a mesma quantidade (em ug) de proteínas nucleares e citosólicas intercaladas obtidas a partir de uma mesma amostra de estrutura encefálica. As bandas representadas referem-se ao hipocampo dorsal de um animal não estressado e tratado apenas com salina, sendo que a primeira coluna corresponde à fração nuclear e a segunda à fração citosólica, seguida de uma figura do padrão de peso molecular utilizado (fornecido pelo fabricante, #1610375, Bio Rad). Foram utilizados anticorpos contra proteínas presentes majoritariamente no núcleo (DNMT3A e Histona-H3) ou no citosol (GAPDH e TrkB), sendo que a DNMT3A e a Histona-H3 foram detectadas apenas na fração nuclear, confirmando que a citosólica não estava contaminada com esta, porém o GAPDH foi detectado em ambas as frações, sem distinção aparente na densidade óptica. Dado isso, adicionou-se a análise de outra proteina cujo anticorpo estava disponível no laboratório: o TrkB (#4603, Cell Signaling), receptor alvo do BDNF, que apresenta um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático tirosina kinase e este, visivelmente, apresentou uma densidade óptica menor na fração nuclear, fato que somado ao contexto de que as proteínas são sintetizadas no núcleo e podem estar presentes em tal fração em uma quantia menor mesmo que sejam citosólicas, sugerem que a extração nuclear realizada foi eficiente.

APÊNDICE II: Imagens representativas do *Western Blotting.*

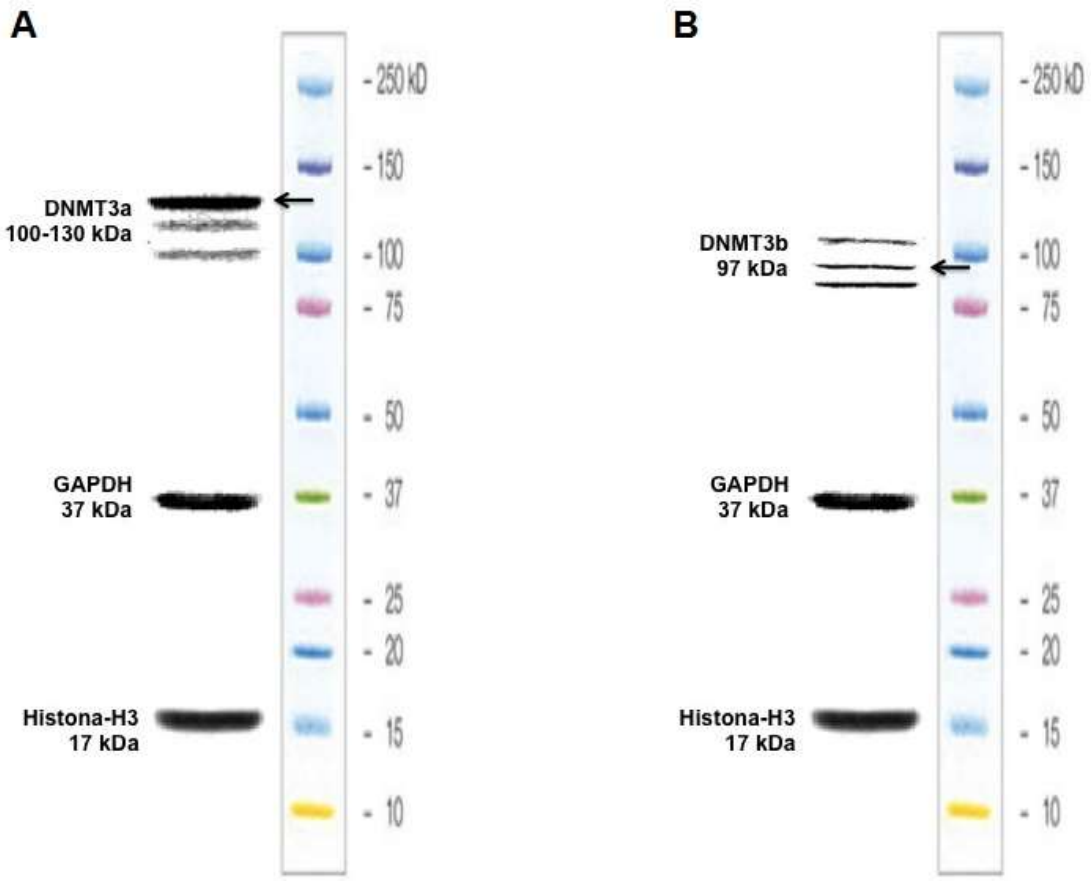

Figura 19. Imagens representativas das análises conduzidas para quantificação da expressão de DNMTs por *Western Blotting*. **A)** Expressão de DNMT3a: Foram detectadas 3 bandas entre 100 e 130 kDa (o que está de acordo com o peso molecular predito pelo fabricante do anticorpo), sendo quantificada a densidade óptica da banda de maior peso molecular, pois esta apresentou expressão proeminente em todas as membranas e amostras analisadas no estudo (banda indicada pela seta, em aproximadamente 130 kDA). **B)** Expressão de DNMT3b: Foram detectadas 3 bandas entre aproximadamente 75 e 110 kDa, porém, conforme o peso molecular predito pelo fabricante do anticorpo indicava 97 kDa, a densidade óptica da banda mais próxima a isto foi quantificada no presente estudo (indicada pela seta). Em todas as membranas também foram detectados o GAPDH e a Histona-H3, possíveis normalizadores da expressão das DNMTs, os quais apresentaram uma única banda cada no mesmo peso molecular predito pelos fabricantes (37 e 17 kDa respectivamente).

APÊNDICE III: Efeito <u>rápido</u> do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a expressão de proteínas *housekeeping* em estruturas encefálicas de ratos e os níveis de <u>DNMT3a</u> normalizados por estas.

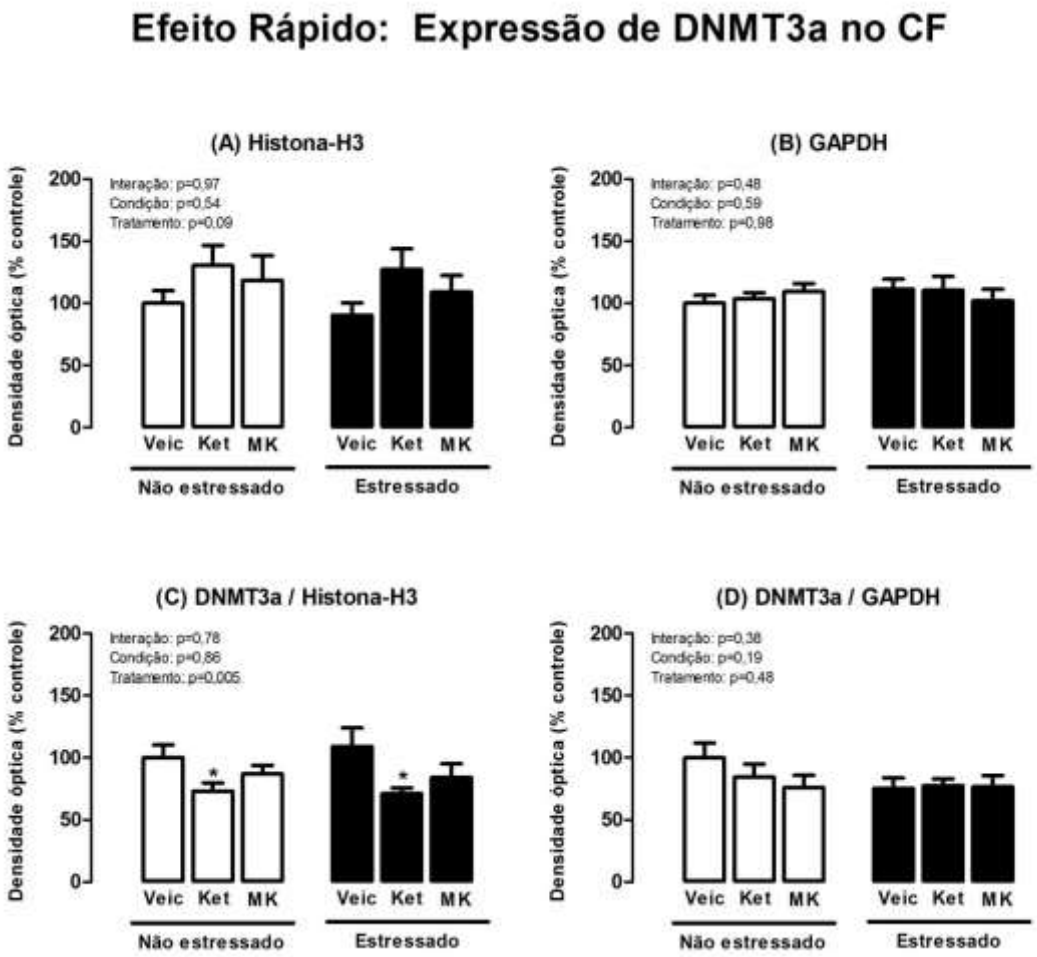

Figura 20. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no córtex frontal (CF) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 1 hora após a administração farmacológica para estudo do efeito rápido dos antagonistas do receptor NMDA (n=10-13/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA. **(C):** O tratamento induziu um efeito significativo sobre os níveis de DNMT3a normalizados por Histona-H3 (Tratamento: [$F(2,71)=5,59$, $p<0,05$; two-way ANOVA]) e análise One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls apontou diminuição significativa de tais níveis no grupo Ket comparado ao grupo veic em animais NS e ST ($F(2,34)=3,69$, $*p<0,05$]). Esse resultado, no entanto, pode ser proveniente da tendência apresentada para efeito do tratamento sobre os níveis de Histona-H3 *per se* **(A)** (Tratamento: [$F(2,68)=2,47$, $p=0,09$, two-way ANOVA]).

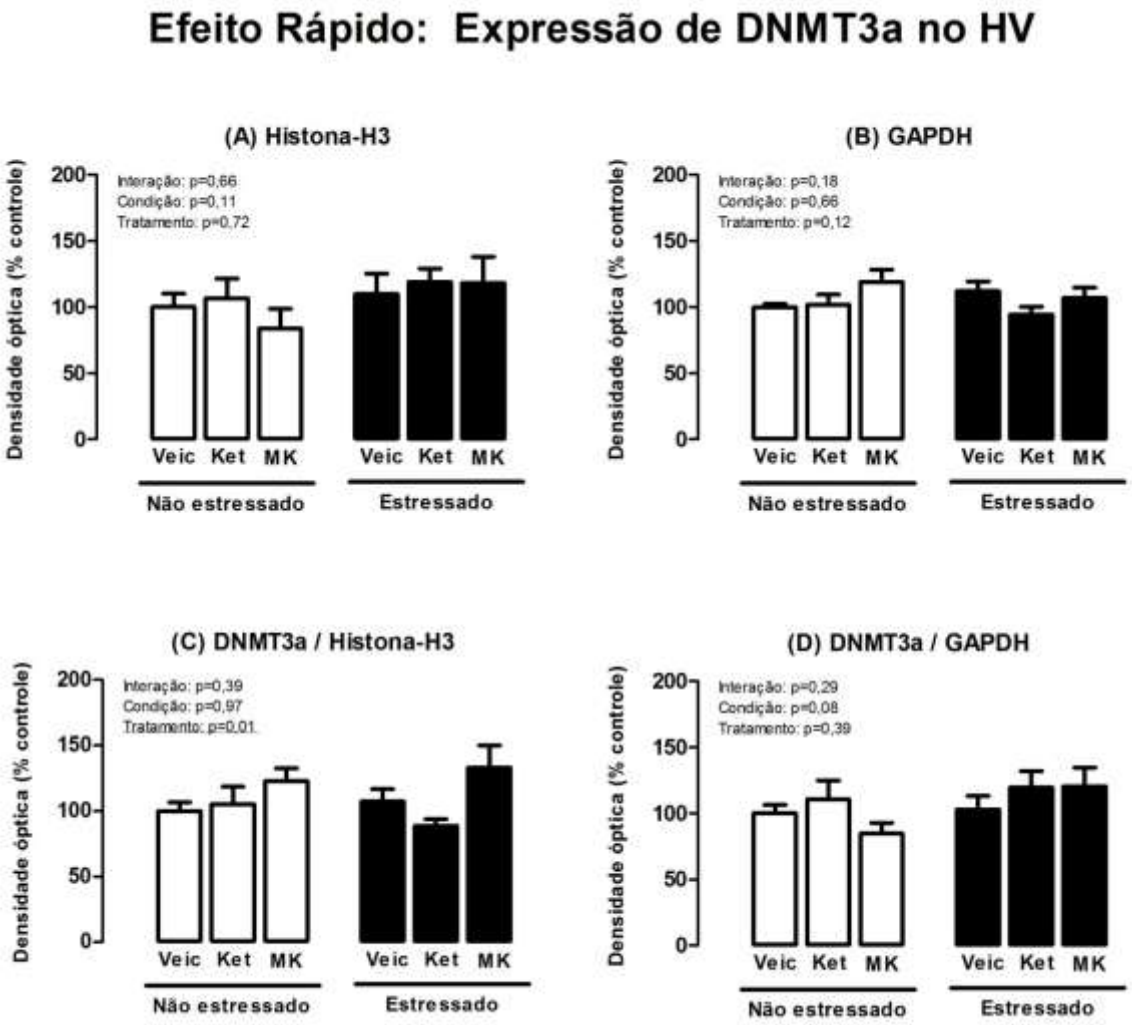

Figura 21. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no hipocampo ventral (HV) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 1 hora após a administração farmacológica para estudo do efeito rápido dos antagonistas do receptor NMDA (n=10-12/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual apontou efeito significativo de um destes fatores apenas no gráfico **(C):** O tratamento alterou os níveis de DNMT3a normalizados por Histona-H3 (Tratamento: [$F(2,60)=4,59$, $p<0,05$]), porém não foram encontradas alterações significativas nos grupos NS ou ST separadamente (NS: [$F(2,30)=1,53$, $p>0,05$, One-way ANOVA]; ST: [$H=2,85$, $p>0,05$, teste de Kruskal-Wallis]).

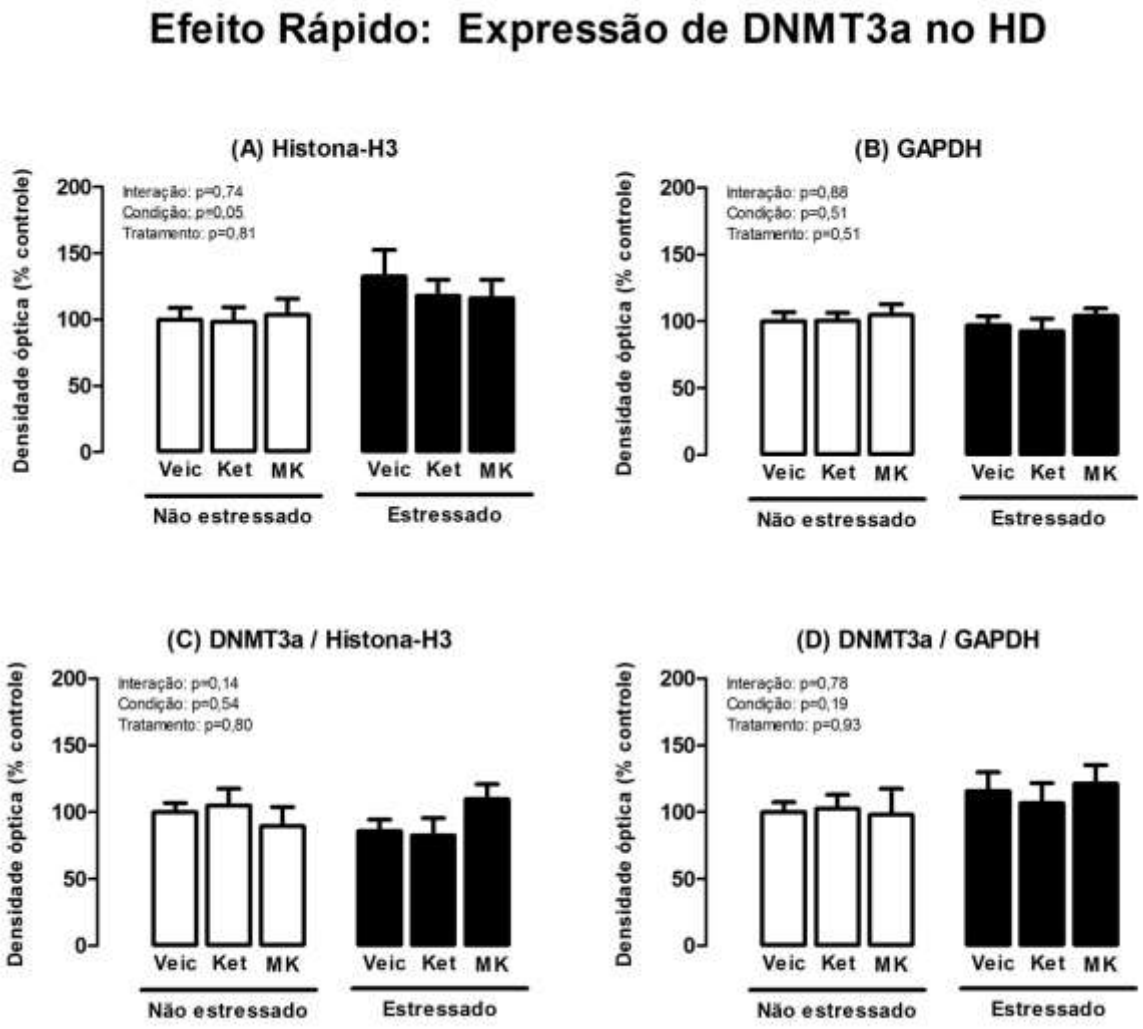

Figura 22. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no hipocampo dorsal (HD) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 1 hora após a administração farmacológica para estudo do efeito rápido dos antagonistas do receptor NMDA (n=9-12/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual apontou efeito significativo de um destes fatores apenas no gráfico **(A):** O estresse alterou os níveis de Histona-H3 *per se* (Condição: [F(1,59)=3,90, p=0,05]), porém não foi encontrado efeito significativo comparando-se apenas os grupos veic NS e veic ST (U=38, p=0,1, teste de Mann Whitney).

APÊNDICE IV: Efeito <u>rápido</u> do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a expressão de proteínas *housekeeping* em estruturas encefálicas de ratos e os níveis de <u>DNMT3b</u> normalizados por estas.

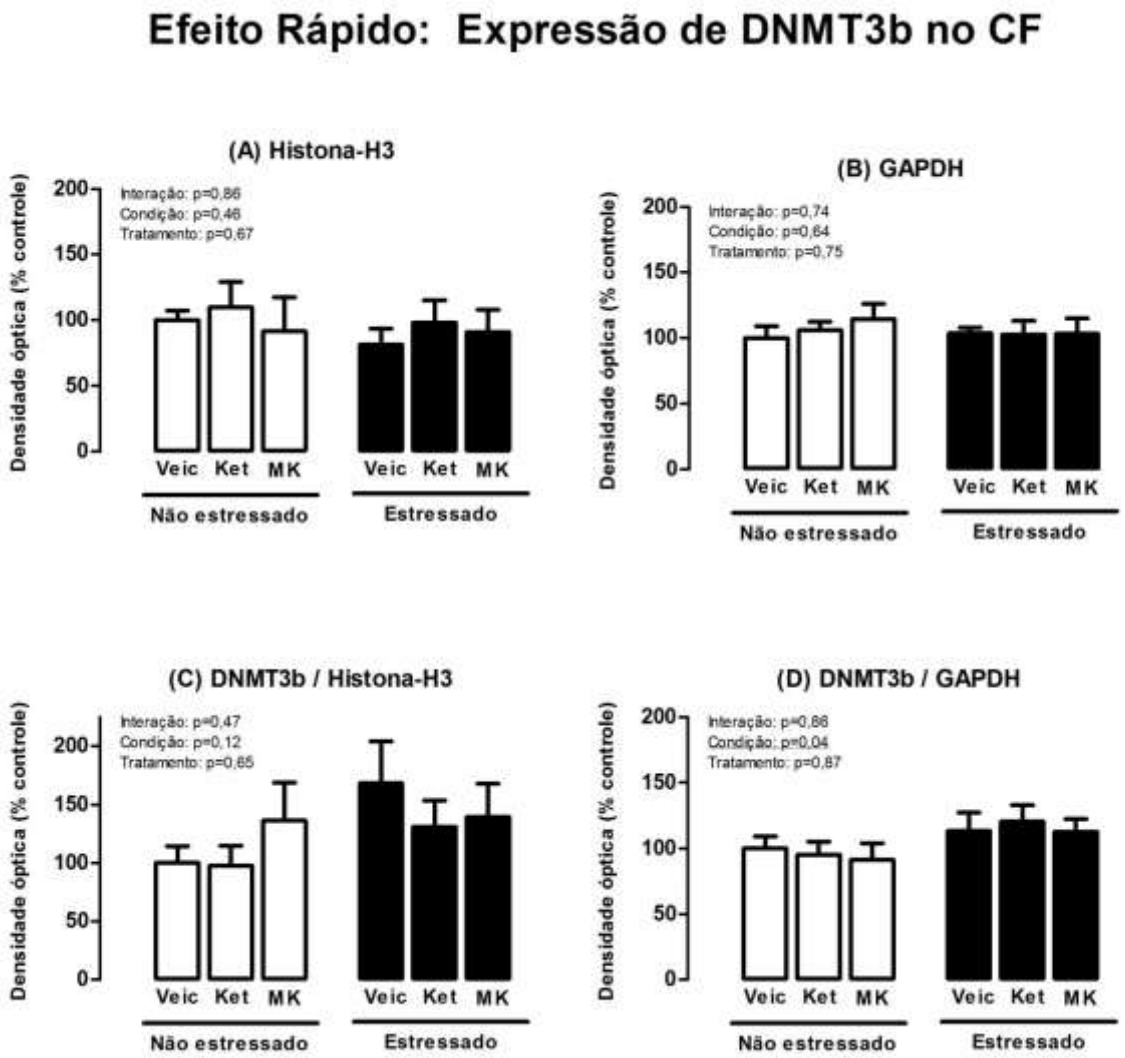

Figura 23. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no córtex frontal (CF) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 1 hora após a administração farmacológica para estudo do efeito rápido dos antagonistas do receptor NMDA (n=5-8/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual apontou efeito significativo de um destes fatores apenas no gráfico **(D):** O estresse alterou os níveis de DNMT3b normalizados por GAPDH (Condição: [$F(1,32)=0,67$, $p<0,05$]), porém não foi encontrado efeito significativo comparando-se apenas os grupos veic NS e veic ST ($U=10$, $p=0,24$, teste de Mann Whitney).

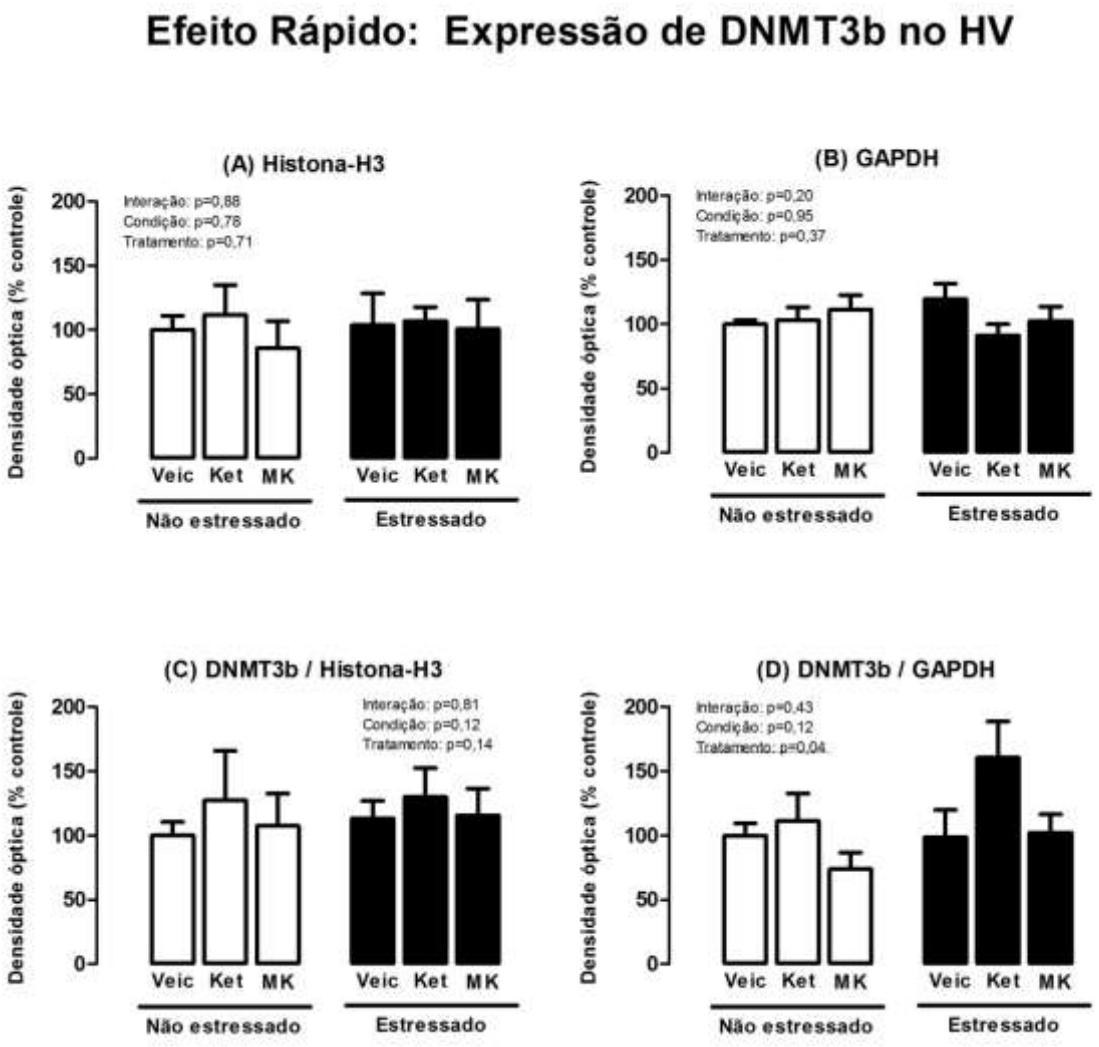

Figura 24. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no hipocampo ventral (HV) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 1 hora após a administração farmacológica para estudo do efeito rápido dos antagonistas do receptor NMDA (n=6-8/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual apontou efeito significativo de um destes fatores apenas no gráfico **(D):** O tratamento alterou os níveis de DNMT3b normalizados por GAPDH (Tratamento: [$F(1,37)=2,46$, $p<0,05$]), porém não foram encontradas alterações significativas nos grupos NS ou ST separadamente (NS: $F(2,19)=1,31$, $p>0,05$; ST: $F(2,18)=2,42$, $p>0,05$, One-way ANOVA).

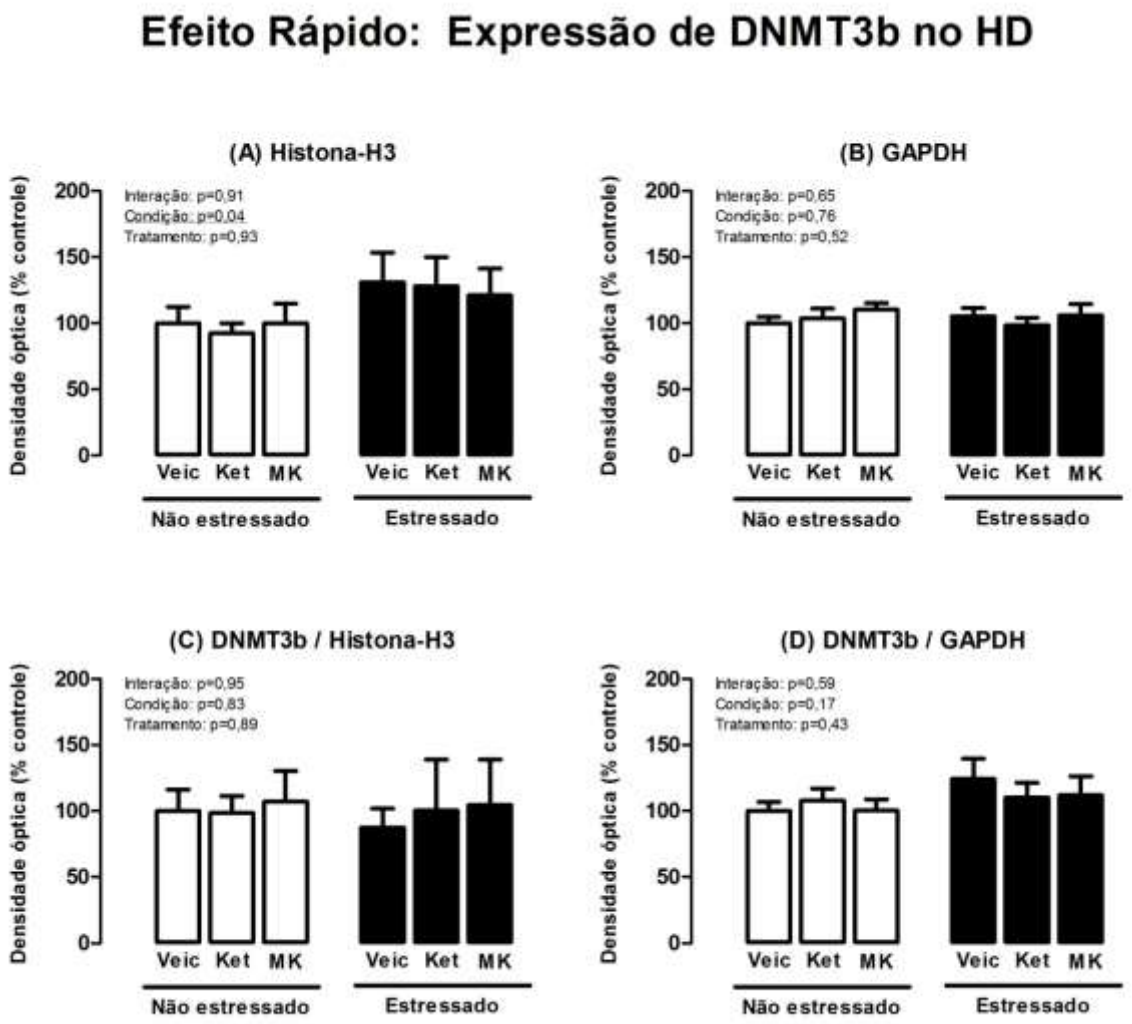

Figura 25. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no hipocampo dorsal (HD) de ratos 1h após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 1 hora após a administração farmacológica para estudo do efeito rápido dos antagonistas do receptor NMDA (n=6-11/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual apontou efeito significativo de um destes fatores apenas no gráfico **(A):** O estresse alterou os níveis de Histona-H3 *per se* (Condição: [$F(1,44)=4,31$, $p<0,05$]), porém não foi encontrado efeito significativo comparando-se apenas os grupos veic NS e veic ST ($t(17)=1,3$, $p=0,21$, teste t de Student).

APÊNDICE V: Efeito <u>sustentado</u> do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a expressão de proteínas *housekeeping* em estruturas encefálicas de ratos e os níveis de <u>DNMT3a</u> normalizados por estas.

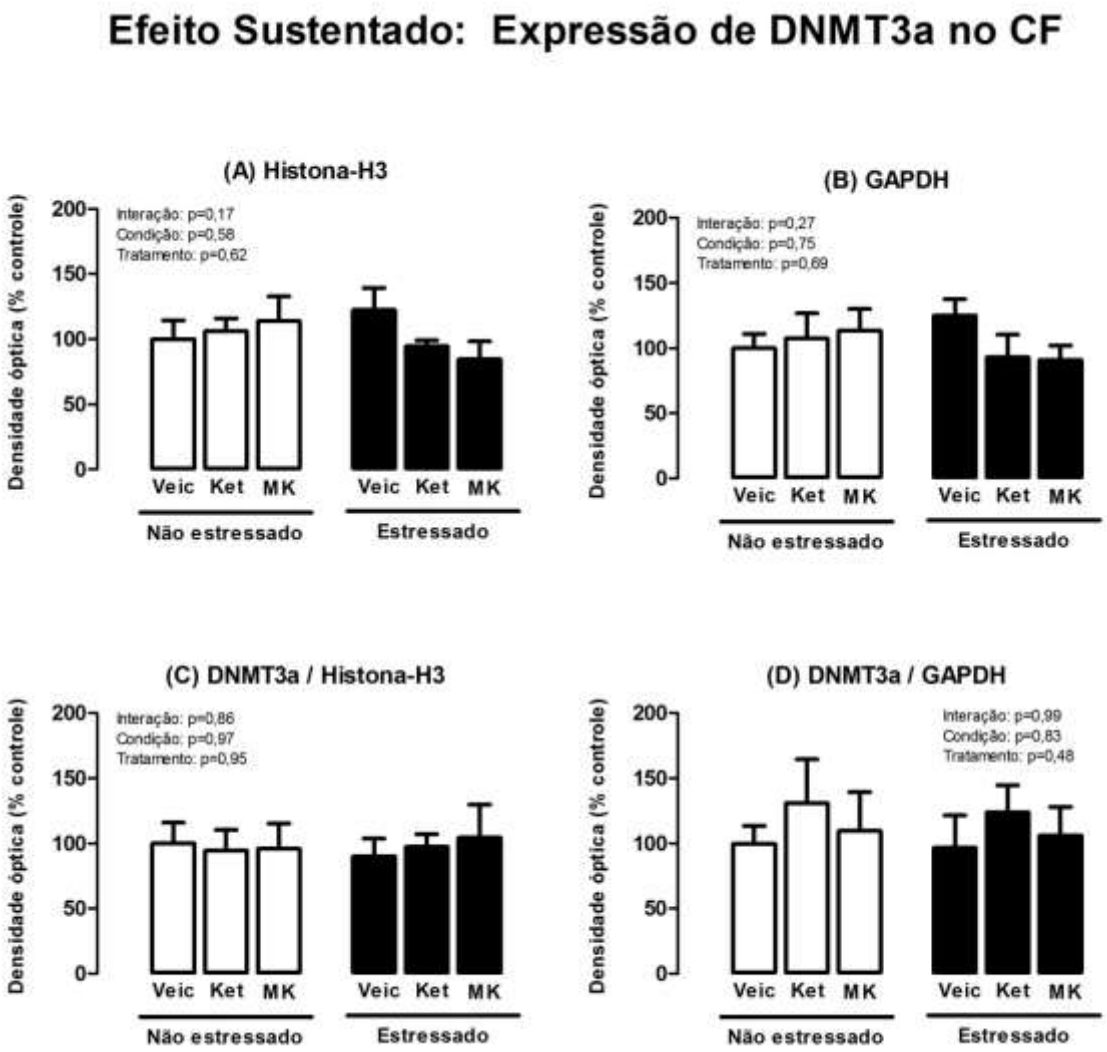

Figura 26. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no córtex frontal (CF) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica para estudo do efeito sustentado dos antagonistas do receptor NMDA (n=6-8/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual não apontou efeito significativo de nenhum dos fatores analisados em quaisquer dos gráficos. Análise one-way ANOVA também não apontou alterações significativas nos grupos NS ou ST separados.

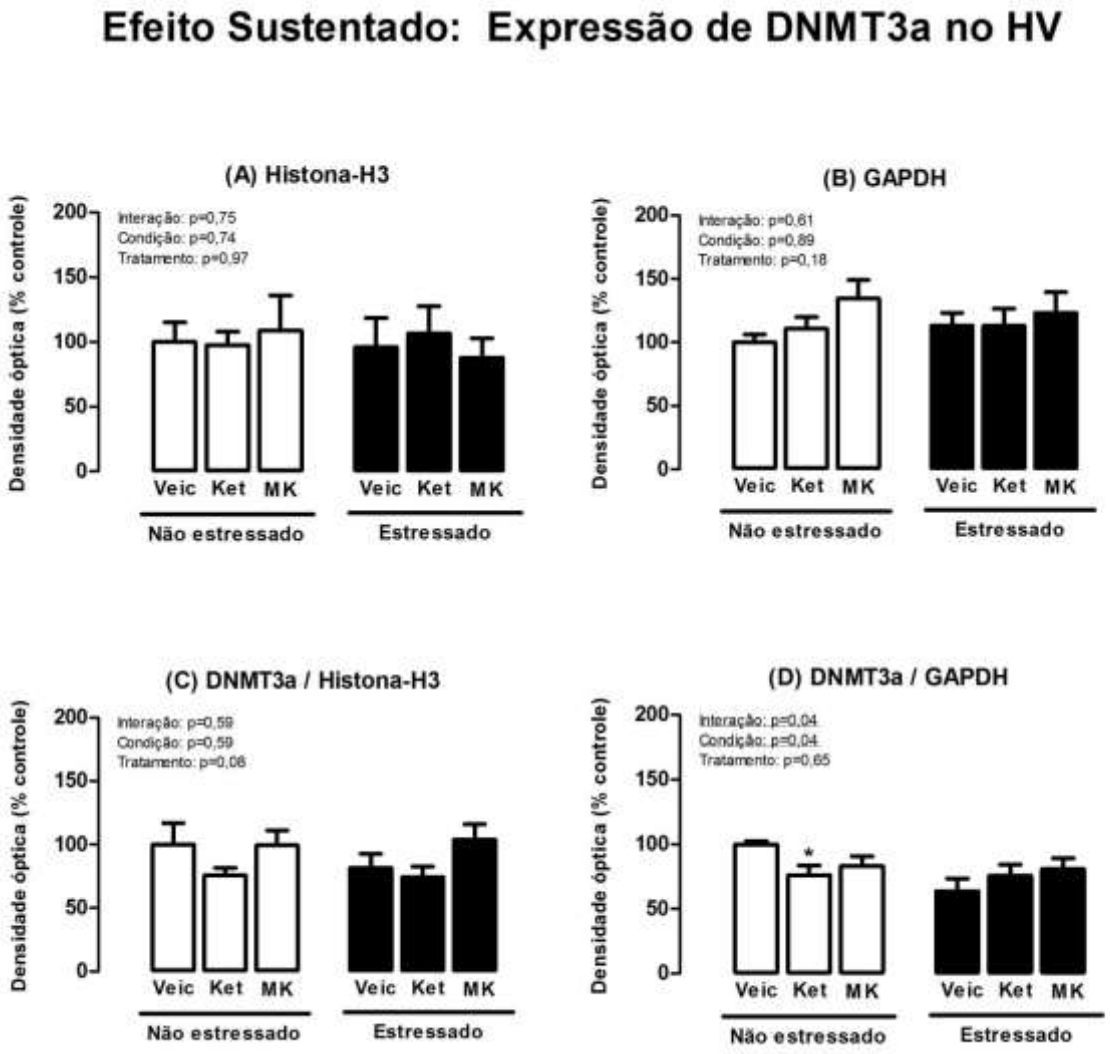

Figura 27. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no hipocampo ventral (HV) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica para estudo do efeito sustentado dos antagonistas do receptor NMDA (n=6/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual apontou efeito significativo apenas no gráfico **(D):** O estresse alterou os níveis de DNMT3a normalizados por GAPDH e ainda houve uma interação significativa entre esta condição e o tratamento farmacológico (Condição: [$F(1,29)=4,46$, $p<0,05$]; Interação: [$F(2,29)=3,37$, $p<0,05$]). Análise posterior por one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls apontou diminuição significativa de tais níveis no grupo Ket comparado ao grupo veic em animais NS ($F(2,15)=3,89$, *$p<0,05$). Nos demais gráficos não foram encontradas diferenças significativas por análise two-way ANOVA ou one-way ANOVA nos grupos NS e ST separados, embora alguns tenham apresentado uma tendência relevante ao efeito do tratamento.

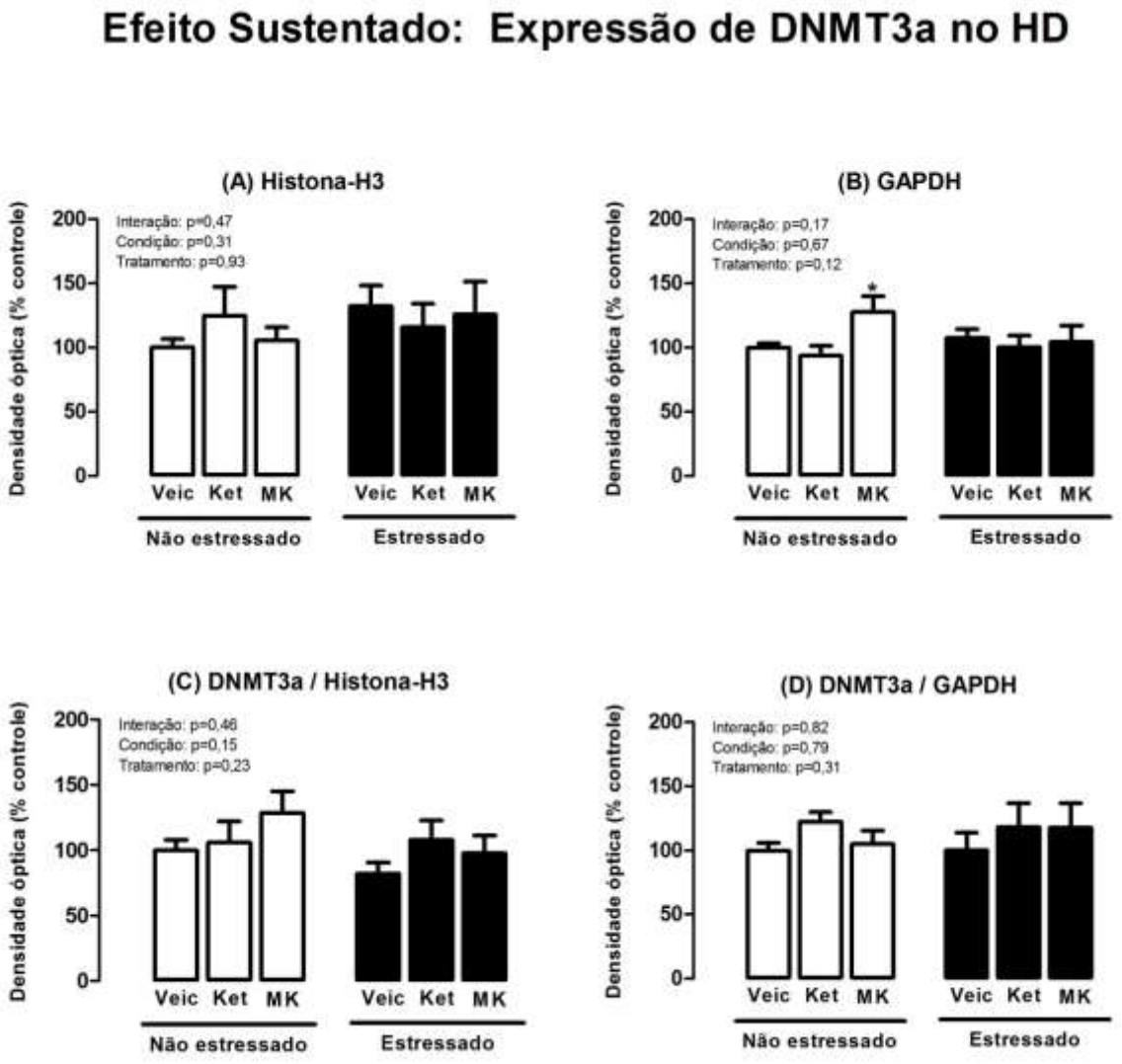

Figura 28. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3a/Histona-H3 **(C)** e DNMT3a/GAPDH **(D)** no hipocampo dorsal (HD) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica para estudo do efeito sustentado dos antagonistas do receptor NMDA (n=8-10/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual não apontou efeito significativo de nenhum dos fatores em quaisquer dos gráficos. No entanto, análise estatística por one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls demonstrou um aumento significativo da expressão de GAPDH *per se* em animais NS tratados com MK *versus* veic do mesmo grupo, conforme gráfico **(B)** ($F(2,24)=4,74$, $^*p<0,05$).

APÊNDICE VI: Efeito <u>sustentado</u> do estresse e de antagonistas do receptor NMDA sobre a expressão de proteínas *housekeeping* em estruturas encefálicas de ratos e os níveis de <u>DNMT3b</u> normalizados por estas.

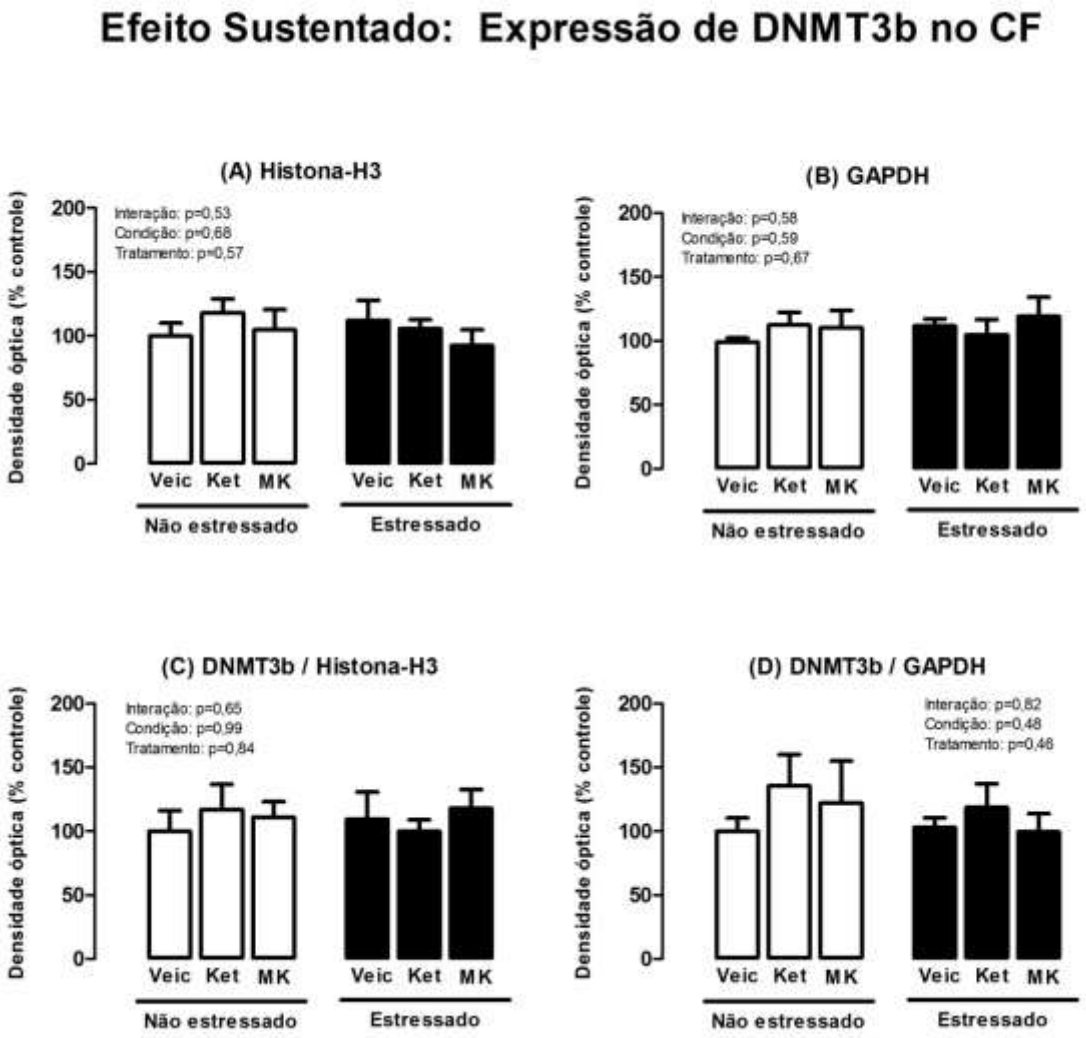

Figura 29. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no córtex frontal (CF) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica para estudo do efeito sustentado dos antagonistas do receptor NMDA (n=5-7/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual não apontou efeito significativo de nenhum dos fatores em quaisquer dos gráficos, assim como análise por one-way ANOVA também não apontou quaisquer efeitos significativos nos grupos NS ou ST separadamente.

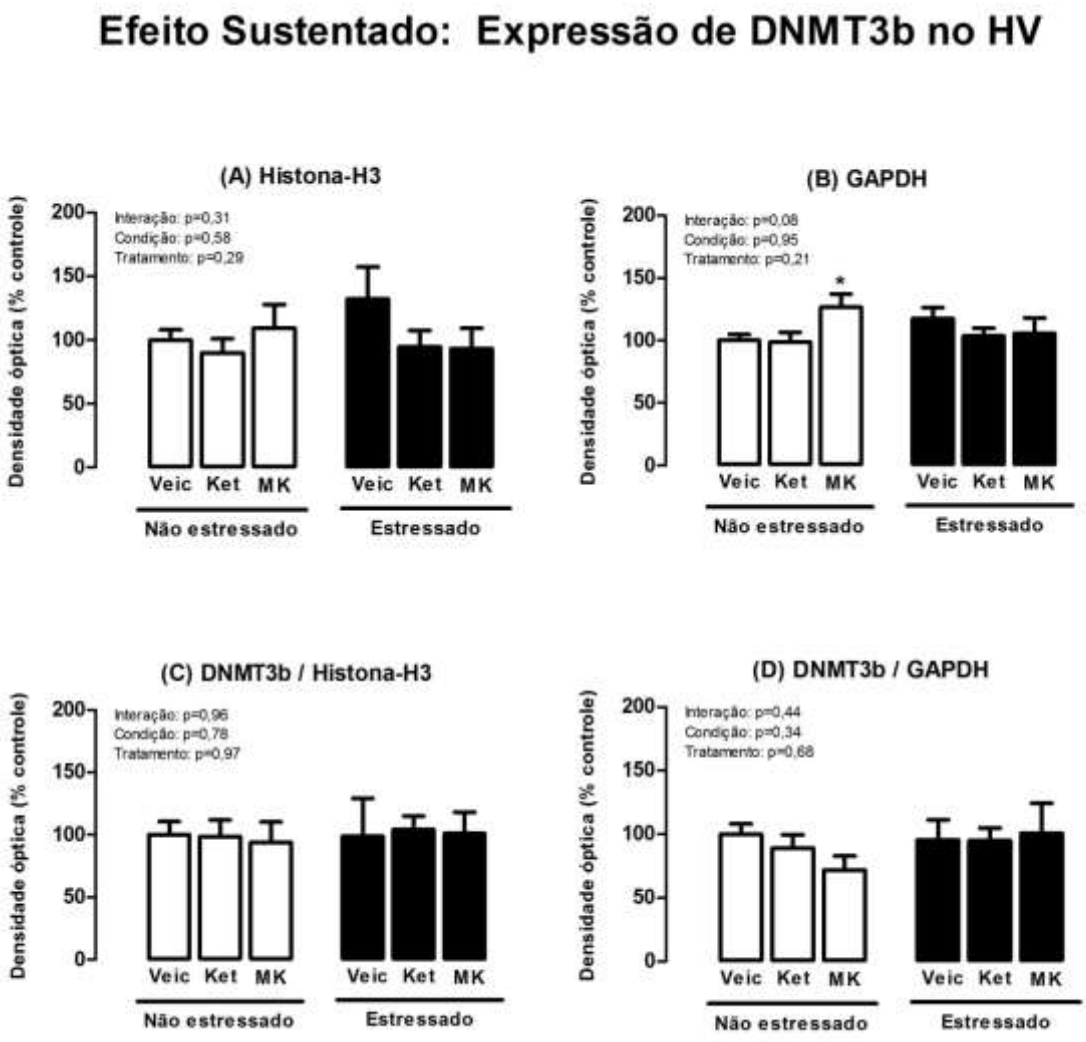

Figura 30. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no hipocampo ventral (HV) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica para estudo do efeito sustentado dos antagonistas do receptor NMDA (n=7-10/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual não apontou efeito significativo de nenhum dos fatores em quaisquer dos gráficos. No entanto, análise estatística por one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls demonstrou um aumento significativo da expressão de GAPDH *per se* em animais NS tratados com MK *versus* veic do mesmo grupo, conforme gráfico **(B)** ($F(2,25)=4,09$, $^*p<0,05$).

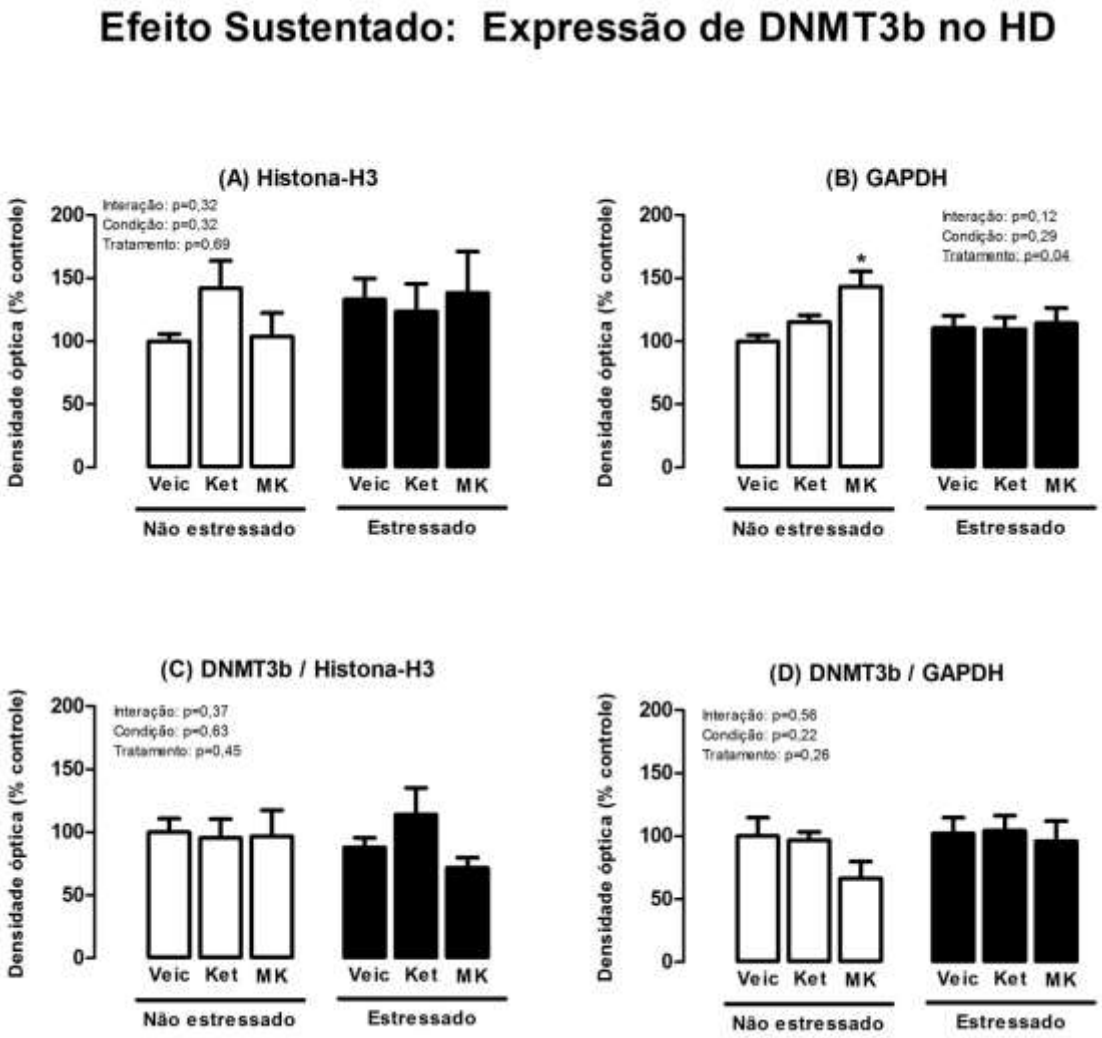

Figura 31. Expressão (quantificada por *western blotting*) de Histona-H3 **(A)**, GAPDH **(B)**, DNMT3b/Histona-H3 **(C)** e DNMT3b/GAPDH **(D)** no hipocampo dorsal (HD) de ratos 7 dias após administração sistêmica de S(+)-ketamina 10mg/Kg (Ket) ou MK-801 0,025mg/Kg (MK). Os animais foram submetidos ao pré-teste do nado forçado 23h antes do tratamento (colunas pretas; estressados (ST)) ou apenas ao tratamento (colunas brancas; não estressados (NS)) e as amostras foram coletadas 7 dias após a administração farmacológica para estudo do efeito sustentado dos antagonistas do receptor NMDA (n=6-8/grupo). Dados representam média ± epm. Valores de interação, condição e tratamento referem-se à análise estatística por two-way ANOVA, a qual apontou efeito significativo apenas no gráfico **(B):** O tratamento alterou os níveis de GAPDH *per se* (Tratamento: [F(2,38)=3,28, p<0,05]). Análise posterior por one-way ANOVA seguida de Newman-Keuls apontou aumento significativo de tais níveis no grupo NS tratado com MK comparado ao veic do mesmo grupo (F(2,25)=6,28, *p<0,05). Nos demais gráficos não foram encontradas diferenças significativas por análise two-way ANOVA ou one-way ANOVA nos grupos NS e ST separados, embora alguns tenham apresentado uma tendência relevante ao efeito.

Anexo

Anexo I: Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 14.1.152.53.1), intitulado "Participação de mecanismos epigenéticos na mediação do efeito tipo-antidepressivo induzido por antagonistas do receptor NMDA", de autoria de **Karina Montezuma e Sâmia Regiane Lourenço Joca**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 29/09/2014.
Colaboradores: Caroline Biojone

This is to certify that the work (Protocol number 14.1.152.53.1), entitled: "Participação de mecanismos epigenéticos na mediação do efeito tipo-antidepressivo induzido por antagonistas do receptor NMDA", by **Karina Montezuma and Sâmia Regiane Lourenço Joca** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, September, 29 2014.
Duração prevista do projeto: 30/09/2014 a 15/07/2016

Ribeirão Preto, 30 de Setembro de 2014.

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Presidente da CEUA

João Fernando Velho de Andrade Diniz
Secretário da CEUA

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 3526 – Fax: (16) 3602 3526