Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Participação da via BDNF-TRkB-mTor do córtex pré-frontal medial ventral no efeito tipo antidepressivo induzido por inibidores da metilação do DNA

Angélica Caroline Dutra Romano Suavinha

Ribeirão Preto

2014

Participação da via BDNF-TRkB-mTor do córtex préfrontal medial ventral no efeito tipo antidepressivo induzido por inibidores da 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 Regiane Lourenço Joca

Orientada: Angélica Caroline Dutra Romano Suavinha

Versão corrigida da Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 24/04/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Ribeirão Preto

2014

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.

Romano, A.C.D.

Participação da via BDNF-TRkB-mTOR do córtex pré-frontal medial ventral no efeito tipo antidepressivo induzido por inibidores da metilação do DNA. Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2014.

49 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.Efeito antidepressivo. 2. Inibidores das DNMTs.
3.Via BDNF-TRkB-mTOR.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Angélica Caroline Dutra Romano Suavinha

Título do trabalho: Participação da via BDNF-TRkB-mTOR do córtex pré-frontal medial ventral no efeito antidepressivo induzido pelos inibidores da 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.

Orientador(a): Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____ Assinatura: _____

Agradecimentos

A minha orientadora, Profª Drª Sâmia Regiane Lourenço Joca, por todo apoio e orientação a mim dedicados.

Aos amigos de laboratório pelas discussões de grupo, experiências trocas e principalmente, pela amizade.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela estrutura e condições oferecidas para o desenvolvimento do projeto.

A Fapesp pela bolsa de mestrado concedida.

Em especial, agradeço a toda a minha família, pelo apoio e amor incondicional.

RESUMO

Romano, A.C.D. Participação da via BDNF-TRkB-mTOR do córtex pré-frontal medial ventral no efeito tipo antidepressivo induzido por inibidores da metilação do DNA. 49 p. 2014. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. 2014.

Recentemente suspeitas de que mecanismos epigenéticos poderiam estar relacionados à fisiopatologia da depressão foram levantadas. Estudos recentes indicam que as alterações na transcrição gênica, induzidas por estresse ou por drogas antidepressivas, parecem envolver mecanismos epigenéticos. Nesse sentido, resultados preliminares de nosso grupo de pesquisa indicaram pioneiramente inibição global da metilação de DNA através da administração sistêmica do agente inibidor da DNA metiltransferase (DNMTs), 5-aza-2-deoxicitidina (5-azaD), induz efeito tipo-antidepressivo, dose-dependente, no modelo animal do nado forçado em ratos(Sales *et al.*, 2011). O córtex pré-frontal medial ventral (CPFMv) é uma estrutura límbica intimamente relacionada com a neurobiologia da depressão. Evidências recentes indicam que o efeito tipo-antidepressivo aparece associado a aumento dos níveis da neurotrofina BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) e de seu receptor TrkB no CPFMv, sendo a sinalização intracelular mediada pela ativação da proteína m-TOR. Contudo, não há evidências de que esses mecanismos moleculares estariam envolvidos nos efeitos induzidos pelos inibidores da metilação do DNA. Sabe-se, no entanto, que tanto o BDNF quanto TrkB têm sua expressão regulada por metilação do DNA. Diante disso, o objetivo presente trabalho será investigar a participação da via BDNF-TrkB-mTOR do CPFMv no efeito antidepressivo induzido por inibidores da metilação de DNA. Para tanto, ratos tratados com inibidores da metilação de DNA (5-azaD ou RG-108), em dois momentos diferentes (imediatamente após o PT e 23horas após o PT) foram submetidos ao teste do nado forçado (FST). Outro grupo de animais recebeu uma injeção intra-CPMv de k252a ou Rapamicina, 40 minutos antes do teste e uma injeção de BDNF intra-CPFMv, 30 minutos antes do teste. Em outro experimento, grupos independentes de animais submetidos ao nado forçado foram tratados sistemicamente com RG-108 e receberam injeção intra-CPFMv de K252a (antagonista de Trk) ou de rapamicina (inibidor da m-Tor), a fim de investigar se o efeito dessas drogas depende da via BDNF-TrkB-mTOR no CPFMv. Um grupo independente foi tratado com RG108 e CPFM desses animais foi dissecado para posterior análise da expressão de BDNF, TrkB e m-TOR, bem como da metilação de DNA. O tratamento com RG108 e 5azaD sistêmico reduziu o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao nado forçado nos dois tempo de administração. A administração intra-CPFMv de BDNF promoveu efeito antidepressivo no FST, e esse efeito foi bloqueado pela administração de k252a ou Rapamicina no CPFMv. No mesmo sentido, o efeito antidepressivo do RG108 sistêmico foi bloqueado pela administração intra-CPFMv de k252a ou Rapamicina. Entretanto, a medida dos níveis de metilação global no CPFMv não apresentou alteração como tratamento com RG108, e também não mostrou alteração nos níveis de BDNF presente no CPF. O tratamento com RG108 não alterou a expressão, bem como a ativação de TRkB e mTOR. Concluímos que os inibidores da metilação do DNA apresentam agudamente efeito tipo antidepressivo rápido, que necessita da funcionalidade integral da via BDNF-TRkB-mTOR. Entretanto, esse efeito parece não alterar a síntese e expressão das proteínas envolvidas nessa via no que diz respeito ao CPFmv.

Palavras chave: inibidores de metilação do DNA, BDNF, TRkB, mTOR, antidepressivo, nado forçado.

ABSTRACT

Romano, A.C.D. Participation BDNF-TrkB-mTOR pathway prefrontal medial ventral cortex in antidepressant-like effect induced by inhibitors of DNA methylation. 49 p. 2014. Dissertation (Masters). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2014.

Recent studies indicate that changes in gene transcription induced by stress or antidepressant drugs appear to involve epigenetic mechanisms. Accordingly, results of our research group pioneered indicated global inhibition of DNA methylation through systemic administration of an inhibitor of DNA methyltransferase (DNMTs), 5-aza-2-deoxycytidine (5-AzaD), induces antidepressant-like effect dose-dependent in the animal model of forced swimming in rats (Sales et al., 2011). The ventral medial prefrontal (vmPFC) cortex is a limbic structure closely related to the neurobiology of depression. Recent evidence indicates that the antidepressant-like effect appears associated with increased levels BDNF (Brain derived neurotrophic factor) and its receptor TrkB in vmPFC, and intracellular signaling mediated by activation of protein mTOR. However, there is no evidence that these molecular mechanisms are involved in the effects induced by inhibitors of DNA methylation. It is known, however, both as BDNF and TrkB expression is regulated by DNA methylation. Thus, the goal of this work is to investigate the role of BDNF-TRkB pathway mTOR-vmPFC in the antidepressant effect induced by inhibitors of DNA methylation. To this end, rats treated with inhibitors of DNA methylation (5-Azad or RG-108), at two different times (immediately after 23hours after the PT and PT) were subjected to the forced swim test (FST). Another group received an intra-vmPFC injection of K252a or Rapamycin 40 minutes before the test, and an injection intra-vmPFC of BDNF 30 minutes before the test. In another experiment, separate groups undergoing the forced swim were treated systemically with RG-108 and received intra-vmPFC of K252a (Trk antagonist) or injection of rapamycin (m-Tor inhibitors) in order to investigate the effect these drugs depends on BDNF-TrkB-mTOR pathway in vmPFC. A separate group was treated with RG108 and mPFC these animals were dissected for analysis of the expression of BDNF and TrkB m-TOR, as well as DNA methylation. The systemic treatment whit 5azaD and RG108 reduced the immobility time of rats subjected to FST administration in both time. The intra-vmPFC BDNF administration promoted antidepressant effect in the FST, and this effect was blocked by the administration of K252a or Rapamycin in vmPFC. Similarly, the antidepressant effect of systemic RG108 was blocked by intra-vmPFC of K252a or Rapamycin administration. However, the measurement of the levels of global methylation in CPFMv did not change as treatment with RG108, and also showed no change in the levels of BDNF present in the CPF. Treatment with RG108 did not alter the expression and activation of TrkB and mTOR. We conclude that inhibitors of DNA methylation present acutely antidepressant-like effect, it needs the full functionality of the BDNF-TrkB-mTOR pathway. However, this effect seems not to alter the synthesis and expression of proteins involved in this pathway at vmPFC.

Keywords: BDNF, TRkB, mTOR, antidepressant, inhibitors of methylation, forced swimming test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos do tratamento com RG 108, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste e imediatamente depois receberam injeção ip de RG-108 (0,2 e 0,4 mg/kg), n =4-6. Dados representam a média +/-EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 19

Figura 2. Efeitos do tratamento com 5azaD, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste e imediatamente após, receberam injeção ip de 5azaD (0,2 e 0,4 mg/kg), n =9-10. Dados representam a média +/-EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 20

Figura 3. Efeitos do tratamento com RG 108, uma hora antes do teste, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste e uma hora antes do teste, receberam a injeção ip de RG-108 (0,2 e 0,4 mg/kg), n =4. Dados representam a média +/-EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 21

Figura 4. Efeitos do tratamento com 5-Aza, uma hora antes do teste, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste, uma hora antes do teste, receberam a injeção ip de 5-azaD (0,2 e 0,4 mg/kg), n = 7-11. Dados representam a média +/-EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 22

Figura 5. Efeitos do tratamento com RG 108, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do campo aberto. Os animais receberam injeção ip de RG-108 (0,2 mg/kg), uma hora antes do inicio do teste, n =5.Dados representam a média +/-EPM;*P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 23

Figura 6. Efeitos do tratamento com 5-AzaD, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do campo aberto. Administração sistêmica aguda de 5-azaD (0,2mg/kg), n =6. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 24

Figura 7. Efeitos do tratamento com BDNF, 30 minutos antes do teste, em animais submetidos ao teste do campo aberto. Administração intra-CPFmv de BDNF (0,1 e 0,2 nmol), n =7. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 25

Figura 8. Efeitos do tratamento com BDNF, 30 minutos antes do teste, em animais submetidos ao teste do campo aberto. Administração intra-CPFMv de BDNF (0,2nmol/0,2µl), n=8-10. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 26

Figura 9. Efeito da administração intra-CPFmv de K252a (0,01nmol/0,2µl), 40 minutos antes do teste, seguida pela administração intra-CPFmv de rhBDNF (0,2nmol/0,2µl), 30 minutos antes do teste do nado forçado (n=6-8). Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pósteste de Dunnets) 27

Figura 10. Efeito da administração intra-CPFmv de Rapamicina (0,2nmol/0,2µl), 40 minutos antes do teste, seguida pela administração intra-CPFmv de rhBDNF (0,2nmol/0,2µl), 30 minutos antes do teste do nado forçado, n=6-8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 28

Figura 11. Efeito da administração intra-CPFmv de K252a (0,01nmol/0,2µl) ou Rapamicina (0,2nmol/0,2µl), uma hora antes do teste, seguida pela administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), n=7. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 29

Figura 12. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre o perfil de metilação global do CPFmv, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 30

Figura 13. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre a expressão do receptor TrkB, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=6-8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 31

Figura 14. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre a fosforilação do receptor TRkB, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=6-7. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 32

Figura 15. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre a expressão da enzima mTOR, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 32

Figura 16. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre a fosforilação da enzima mTOR, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=6-7. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 33

Figura 17. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre os níveis de BDNF do CPF, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=6-8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets) 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-azaD: 5-aza-2`-deoxicitidina

5-HT: Serotonina

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CPFMv: Córtex Pré-frontal Medial Ventral

CpG: Dinucleotídeos Citosina-Guanina

DNMTs: DNA Metiltransferase

DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Médicos

HDAC: Histona Deacetilase

IMI: Imipramina

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

NMDA: Glutamato do tipo N-metil-D-aspartato

RG108: N-Phthalyl-L-tryptophan

rhBDNF: BDNF recombinante

SNC: Sistema Nervoso Central

TrkB: Receptor ligado a tropomiosina (tropomyiosin-related kinase)

TrkA, TrkB e TrkC: Receptor ligado a tropomiosina do tipo A, tipo B e Tipo C respectivamente.

VNS: Estimulação do Nervo Vago

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 7

3 MATERIAL E MÉTODOS 8

3.1 Animais 8

3.2 Drogas 8

3.3 Procedimentos 9

3.3.1 Teste do nado forçado para ratos 9

3.3.2 Teste do Campo Aberto 9

3.3.3 Cirurgia Esteriotáxia 10

3.3.4 Obtenção das amostras e análise do padrão de metilação 10

3.3.5 Imunopreciptação de proteínas 11

3.3.6 Quantificação de proteínas por *Western Blot* 12

3.3.7 Dosagem de dos níveis de BDNF (ELISA). 12

3.4 Análise Estatística 13

4 DESENHO EXPERIMENTAL 14

5 RESULTADOS 19

6 DISCUSSÃO 35

7 REFERÊNCIAS 43

1 INTRODUÇÃO

Os transtornos afetivos, representados parcialmente pela depressão maior, estão entre as três maiores causas de debilitação no mundo, sendo associado à morbidade severa e a um risco aumentado de mortalidade (WHO, 2008). Depressão e distúrbios de humor relacionados ao estresse atingem aproximadamente 17% da população, o que implica, além de sofrimento pessoal, em enorme custo social e econômico (Greenberg *et al.*, 2003). Um recente estudo mostrou que países com baixa renda tem maior incidência de episódios de depressão (14,6%) quando comparados a países de alta renda (11,1%). Especialmente no Brasil, a prevalência desses episódios, avaliada durante 12 meses seguindo os critérios do DSM-IV, atingiu quase o dobro da média dos países de baixa renda (países de baixa renda, 5,9%; Brasil, 10,4%) (Bromet *et al.*, 2011). Mediante esse quadro é possível dizer que essas doenças representam um grave problema de saúde pública para a sociedade moderna.

A depressão maior tem sido estudada há anos por especialistas e teorias sobre sua neurobiologia foram propostas. A "teoria monoaminérgica clássica da depressão" surgiu a partir de observações de que drogas antidepressivas produziam seus efeitos através da facilitação da neurotransmissão monoaminérgica (Hindmarch, 2002; Koponen *et al.*, 2005). Assim, as primeiras classes de antidepressivos usadas foram os inibidores da monoamina oxidase e os antidepressivos tricíclicos (drogas que inibem a recaptação de monoaminas), os quais causam diversos efeitos colaterais. Drogas mais seletivas, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (5-HT) e inibidores seletivos da recaptação de 5-HT e noradrenalina foram desenvolvidos posteriormente, porém o uso desses medicamentos não produz resultados terapêuticos completamente satisfatórios (Hindmarch, 2002; Koponen *et al.*, 2005). Outra hipótese envolvida na neurobiologia da depressão é a "hipótese neurotrófica (ou molecular)", a qual está fundamentada principalmente na observação de que a exposição

ao estresse diminui a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, brain derived neurotrophic factor) e induz atrofia apical dendrítica, particularmente no hipocampo e no córtex pré-frontal, sendo que essas mudanças neuroplásticas podem ser atenuadas pelo tratamento crônico com antidepressivos (Koponen *et al.*, 2005; Duman e Monteggia, 2006; Krishnan e Nestler, 2008). Além disso, o bloqueio da expressão de BDNF ou da neurogênese hipocampal impede o aparecimento do efeito antidepressivo em modelos animais, sugerindo que tais alterações plásticas sejam necessárias para o efeito comportamental induzido por antidepressivos (Saarelainen *et al.*, 2003; Adachi *et al.*, 2008). Recentemente, Duman e colaboradores mostraram que a administração sistêmica crônica de BDNF aumentou a mobilidade no nado forçado e a neurogênese hipocampal (Schmidt e Duman, 2010).

Teorias baseadas em estudos mais recentes têm discutido e incluído fatores como a pré-disposição genética, a exposição a eventos de estresse e prejuízos na plasticidade estrutural do SNC como eventos fortemente relacionados ao desenvolvimento da depressão (Manji, Drevets e Charney, 2001; Wurtman, 2005; Price e Drevets, 2010). Nesse sentido, diversos trabalhos têm analisado a relação entre o estresse e a depressão, tendo demonstrado consistentemente que a intensidade do estresse e o modo como o indivíduo reage ao evento estressor podem estar diretamente ligados ao desenvolvimento de episódios depressivos (Amat *et al.*, 2005; Czeh e Fuchs, 2008; Molteni *et al.*, 2009). Diferentes trabalhos já demonstraram que a exposição de animais a modelos de estresse como, por exemplo, o estresse por restrição (Brown et al 2005), estresse social crônico (Rygula *et al.*, 2006) ou o nado forçado (Izquierdo, Wellman e Holmes, 2006) é capaz de causar inibição da proliferação celular no hipocampo e retração dendrítica no córtex pré-frontal (Brown, Henning e Wellman, 2005; Izquierdo, Wellman e Holmes, 2006) e gerar prejuízos comportamentais, como diminuição da atividade exploratória e anedonia (Rygula *et al.*, 2006).

Inúmeros estudos indicam que a exposição ao estresse, através da regulação da expressão gênica, pode alterar a susceptibilidade ao desenvolvimento da depressão, o que pode ocorrer através da interferência com mecanismos epigenéticos (Tsankova *et al.*, 2007; Borrelli *et al.*, 2008). Epigenética refere-se às mudanças no empacotamento do DNA e na estrutura da cromatina que controlam a expressão gênica sem mudar a sequencia do DNA original. Estas alterações na condensação da cromatina podem facilitar ou dificultar o acesso da maquinaria de transcrição, alterando a expressão gênica e levando a diferentes fenótipos celulares (Jones e Takai, 2001). Portanto, modificações epigenéticas são mecanismos importantes através dos quais a experiência (o ambiente) pode modular a função do gene, na ausência de alterações na sequencia de DNA, e produzir mudanças duradouras na disponibilidade de proteínas e, consequentemente, na função da estrutura onde essas se encontram (Tsankova *et al.*, 2007).

As modificações epigenéticas incluem alterações covalentes no DNA (metilação) e modificações pós-traducionais (acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação) na porção N-terminal das histonas, bem como os mecanismos não transcricionais de silenciamento gênico (micro-RNAs, por exemplo)(Kim, Samaranayake e Pradhan, 2009).

Entre os processos que modulam a estrutura da cromatina e a expressão gênica, alterações nas caudas das histonas têm sido os mais estudados em relação à neurobiologia da depressão. Por exemplo, a acetilação das histonas, que é mais frequentemente associada com a ativação da transcrição através da sua capacidade de relaxar áreas condensadas de cromatina, é induzida pelo tratamento crônico com antidepressivos (Tsankova *et al.*, 2006). Além disso, a inibição da enzima responsável por deacetilar histonas (histona deacetilase, HDAC) induz efeitos do tipo antidepressivos em animais (Schroeder *et al.*, 2007; Covington *et al.*, 2009), corroborando a ideia de que o aumento da acetilação e consequente aumento da transcrição de determinados genes induz efeito antidepressivo.

A metilação do DNA é outro importante mecanismo epigenético de regulação da transcrição gênica no sistema nervoso. A metilação do DNA é um processo realizado por DNA metiltransferases (DNMTs), que catalisam uma adição covalente de um grupo metil ao resíduo 5' da citosina, quase que exclusivamente em citosinas quando em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG) (Weber e Schuebeler, 2007). Sítios metilados podem ser alvos de ligação para proteínas específicas, provocando fenômenos adicionais que resultam em estado de cromatina condensada e repressão da transcrição (Weber e Schuebeler, 2007).

Além de seu papel reconhecido no desenvolvimento e diferenciação celular (Kim, Samaranayake e Pradhan, 2009), evidências recentes sugerem que a metilação do DNA também é um importante mecanismo epigenético capaz de modular a plasticidade sináptica no cérebro adulto (Miller e Sweatt, 2007; Covic, Karaca e Lie, 2010). Esta hipótese é reforçada pela evidência de que a exposição a diferentes estressores, como combate social (Laplant *et al.*, 2010), choques nas patas (Miller e Sweatt, 2007) ou cuidados maternos insuficientes (Zhang *et al.*, 2010), aumenta a expressão de DNMTs em diferentes regiões cerebrais, o que é acompanhado por aumento da metilação do DNA e diminuição da expressão de genes que regulam a plasticidade sináptica e neurotransmissão.

Considerando evidências recentes indicando alterações no padrão de metilação do DNA, que promove condensação da cromatina e repressão transcricional, no cérebro de indivíduos deprimidos (Krishnan e Nestler, 2010), resultados de nosso grupo de pesquisa indicaram pioneiramente que a inibição global da metilação de DNA através da administração sistêmica do agente inibidor de DNA metiltransferases (DNMTs), 5-aza-2-deoxicitidina (5-azaD), induz efeito tipo-antidepressivo, dose dependente, no modelo animal do nado forçado em ratos (Sales *et al.*, 2011). Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que tal efeito era acompanhado de diminuição global da metilação do DNA e aumento da expressão de BDNF no hipocampo. Além disso, a administração de 5-azaD no hipocampo

induziu efeito tipo antidepressivo, indicando o envolvimento dessa estrutura nos referidos efeitos.

O conjunto de estruturas envolvido na modulação da resposta comportamental, ao estresse e na neurobiologia da depressão é complexo e compreende muitos locais do Sistema Nervoso Central (SNC). Entretanto, estruturas límbicas, tais como hipocampo, hipotálamo, tálamo, amígdala, giro cingulado e córtex pré-frontal, parecem ter um papel mais importante (Price e Drevets, 2010). Dentre essas estruturas, o córtex pré-frontal medial ventral (CPFMv) tem recebido considerável atenção, uma vez que o CPFMv participa de funções como memória, aprendizado e tomada de decisões, bem como desempenha papel chave na modulação autonômica e endócrina de resposta ao estresse (Czeh e Fuchs, 2008). Ainda, é possível citar que alterações nessa área cortical parecem favorecer o desenvolvimento de transtornos mentais, como ansiedade e depressão (Drevets, 2000; Musazzi *et al.*, 2010). Resultados de nosso grupo de pesquisa sugerem que a ativação do CPFMv durante o estresse favorece o desenvolvimento de suas consequências comportamentais (Scopinho *et al.*, 2010).

Corroborando evidências acima apresentadas, recente trabalho de nosso grupo de pesquisa mostrou que o antagonismo de receptores para glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) no CPFMv de ratos induz efeito tipo antidepressivo em amimais submetidos ao modelo do nado forçado (Pereira V.S., 2011). Ainda nesse sentido, foi mostrado que o efeito tipo antidepressivo agudo de antagonistas de receptor NMDA envolve o aumento da expressão de BDNF no CPF (Autry *et al.*, 2011), sendo essa sinalização mediada por ativação da proteína m-TOR (Li *et al.*, 2010).

O BDNF é a neurotrofina mais abundante no SNC, e age se ligando principalmente a um receptor do tipo tirosina quinase, o TrkB (tropomyiosin-related kinase B), e assim promove a ativação de importantes vias de sinalização envolvidas no controle de mecanismos de plasticidade neural, com destaque para a via BDNF-TrkB-mTOR, nos efeitos

antidepressivos produzidos por antagonistas NMDA. Foi demonstrado, por exemplo, que os efeitos tipo-antidepressivos induzidos agudamente pela administração de ketamina, um antagonista NMDA, são associados ao aumento da síntese de BNDF e que a administração de inibidor da mTOR no córtex pré-frontal medial (CPFMv) impede os efeitos antidepressivos da ketamina. (Li et al., 2010). Portanto, o efeito antidepressivo agudo induzido pela administração de antagonistas NMDA parece envolver a ativação da via BDNF-TrkB-mTOR no CPFM. Contudo, não há evidências de que esses mecanismos estariam envolvidos nos efeitos induzidos pelos inibidores da metilação do DNA. Sabe-se, no entanto, que tanto o BDNF quanto o TrkB têm sua expressão regulada por metilação de DNA (Yamamoto *et al.*, 2008)

Diante das evidências expostas anteriormente, torna-se relevante estudar a participação da via BDNF-TrkB-mTOR do CPFMv no efeito antidepressivo induzido por inibidores da metilação de DNA.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é testar a hipótese de que o efeito tipo antidepressivo agudo induzido por inibidores da metilação de DNA envolve a modulação da via BDNF-TRkB-mTOR, por meio da regulação da expressão desses genes, no CPFMv.

Para tanto, os objetivos específicos são:

- avaliar os efeitos induzidos pelo tratamento sistêmico agudo com inibidor nucleosídico (5-azaD) e não nucleosídico (RG-108) de DNMTs sobre o comportamento de animais submetidos a modelo animal preditivo de efeito antidepressivo, o nado forçado;
- avaliar se o efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração sistêmica de inibidores da metilação do DNA depende da ativação da via BDNF-TrkB-mTOR no CPFMv, através da administração de K252a (antagonista de receptores TRk) e Rapamicina (inibidor de mTOR) no CPFMv de animais submetidos ao nado forçado.
- investigar os efeitos induzidos pelo tratamento sistêmico com inibidores de DNMTs e pela exposição ao estresse de nado forçado sobre o perfil global de metilação de DNA e sobre a expressão de genes candidatos (BDNF, TRkB, mTOR) no CPFMv;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, 200 a 250 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus da USP-RP, os quais foram mantidos aos pares em gaiolas de acrílico (570 cm^2) no biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, em condições controladas: temperatura (25±1°C), ciclo de luz (acesas das 6:00 às 18:00 horas), alimento e água ad libitum. Os procedimentos experimentais descritos neste projeto estão de acordo com as normas preconizadas pelo COBEA (Colégio Brasileiro para Experimentação com Animais) e foram aprovados pelo comitê de ética local CEUA (12.1.235.53.2).

3.2 Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- 5-aza-2`-deoxicitidina (5-azaD ou decitabina, Sigma, St. Louis, MO, USA): inibidor de DNA-metiltransferase, dissolvida em salina isotônica estéril, nas doses de 0.2, 0.4 mg/Kg para administração ip (Sales *et al.*, 2011).

-N-Phthalyl-L-tryptophan (RG108, Tocris, USA): inibidor não nucleosídeo de DNMTs, nas doses de 0.2, 0.4 mg/Kg (Stresemann *et al.*, 2006), dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, imediatamente antes do uso.

- K252a (Sigma-Aldrich): antagonista de receptores TRK, 10 pmol (Casarotto et al 2010), em 0,2 µL salina estéril, injeção bilateral.

- Rapamicina (RPC, LC Laboratories): bloqueador da mTOR, 0,2 nmol (Li *et al.*, 2010) em 0,2 µL de DMSO, injeção bilateral.

- BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor, Human, Recombinant- Promega): Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, 100pmol e 200pmol dissolvido em 0,2 µL de solução salina estéril, injeção bilateral.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Teste do nado forçado para ratos

O teste do nado forçado é um modelo animal usado para verificar os efeitos comportamentais induzidos por drogas antidepressivas que, neste caso, são evidenciados por meio da redução da imobilidade durante o teste (Porsolt, Lepichon e Jalfre, 1977; Porsolt, Bertin e Jalfre, 1978). O modelo consiste em colocar os animais para nadar, individualmente, em um cilindro de acrílico (30 cm de diâmetro, 40 cm de altura, contendo 25 cm de água com temperatura de 24±1°C; modificado de (Cryan, Valentino e Lucki, 2005), por um período de 15min (pré-teste). Após esse período, os animais foram retirados e colocados, separadamente, para secar, antes de retornarem para suas caixas de origem. Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a sessões de 5 minutos de nado forçado, quando se registra o tempo total de imobilidade (o animal permanece parado realizando apenas pequenos movimentos necessários à flutuação). A análise foi feita de maneira cega. A água foi trocada entre as sessões de nado para evitar a influência de substâncias de alarme (Abel e Bilitzke, 1990).

3.3.2 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto (arena) foi utilizado para medir a atividade locomotora dos animais (Essman, 1967; Saenz, Villagra e Trias, 2006). Os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena (70 cm x 70 cm x 40 cm). Após 30s de adaptação, o comportamento do animal foi registrado durante 5 min, com auxílio de uma câmera de vídeo localizada a 2 m acima da arena. Durante esse período, foram contados os números de cruzamentos que o animal fez entre os quadrantes, sendo que cada cruzamento só é contado quando o animal atravessa com as quatro patas de um quadrante para o outro. O número de

cruzamentos realizado por cada animal nesse período serviu como índice de sua atividade locomotora. Após cada ensaio, a arena foi limpa com solução de álcool 70%.

3.3.3 Cirurgia Esteriotáxica

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% na dose de 1ml/1kg e fixados na armação estereotáxica. Uma cânula guia (11.0 mm OD) de aço inoxidável foi implantada bilateralmente e direcionada para o córtex pré-frontal medial de acordo com coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1997). A ponta da cânula estava 1,0mm acima do local da injeção e a cânula foi presa ao osso do crânio por parafuso de aço inoxidável e cimento acrílico. Um mandril foi colocado na cânula guia para evitar sua obstrução. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam administração de pentabiótico veterinário (i.m., 0,1mL/100g) e do anti-inflamatório Banamine (0,1mL/100g), com o objetivo de evitar quadros infecciosos e reduzir a dor pós-operatória. Ao final da cirurgia, os animais foram acondicionados em uma gaiola com aquecimento, onde permaneceram sob observação por 30 minutos. Após esse período, os animais retornaram às suas gaiolas, onde permaneceram em repouso por 5-7 dias, até o início dos experimentos. Posteriormente, foram realizados os experimentos comportamentais e as injeções intracerebrais, as quais foram administradas com auxílio de agulhas dentárias (0.3mm OD) que foram introduzidas bilateralmente através da cânula guia (1.0mm abaixo do fim da cânula). Foi injetado um volume de 0.2µL/lado, durante 1 minuto, usando uma microsseringa (Hamilton, USA) controlada por uma bomba de infusão.

3.3.4 Obtenção das amostras e análise do padrão de metilação

Imediatamente após o protocolo experimental, os animais foram anestesiados profundamente (hidrato de cloral 5%, 10 ml/Kg) e seus encéfalos removidos para dissecação do córtex pré-frontal medial. As estruturas foram imediatamente trituradas em tampão de lise

(20 mM Tris-HCl; pH 8.0; 137 mM NaCl; 10% glycerol; cocktail inibidor de protease, P2714, Sigma) e congeladas em freezer -80°C até o momento do uso.

A análise do perfil global de metilação de DNA foi realizado conforme descrito por Sales *et al.* (2011). O DNA foi extraído utilizando AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi digerido com Nuclease P1 (# P2640, Sigma) (2 U · mg-1 de DNA, 4 horas a 65 ° C em tampão acetato pH 5,3 mM 20) e com fosfatase alcalina (# N8630, Sigma) (1 U · mg-1 de DNA, 2 horas a 65 ° C em Tris-HCl 20 mM pH 7,5). Em seguida o DNA digerido foi precipitado em puro etanol frio e NaCl 5 M a -20 ° C por 18 horas e centrifugadas em 20000g por 15 min. O pellet foi ressuspenso em tampão TE (5 mMTris-HCl, 0,1 mMEDTA, pH 8,5) e o DNA metilado foi quantificado usando a o DNA Methylation EIA kit (# 589324, Cayman Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. A medida de absorbância foi realizada utilizando leitor de placas VictorX3 e software (Perkin Elmer). Várias concentrações de 5-metil-2'- desoxicitidina purificada (fornecido pelo kit) foram utilizadas para construção da curva padrão. A concentração da amostra (ng · mL-1) foi calculado com base em 4 parâmetros da equação logística de curva padrão.

3.3.5 Imunopreciptação de proteínas

Resumidamente, uma alíquota de amostra contendo 500µg de proteína total foi incubada com 2µg de anticorpo anti-TrKA (Santa Cruz, #sc20539) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida 20 µL de solução contendo *beads* de agarose (Protein G-Plus; Santa Cruz, #sc2002) foi adicionada a cada amostra incubando, a 4°C, por 30minutos sobre agitação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em 1000g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80°C para posterior analisa das proteínas.

3.3.6 Quantificação de proteínas por *Western Blot*

As medidas de TrkB, mTOR foram feitas por meio de *western blot (Saarelainen et al., 2003; Li et al., 2011)*, utilizando anticorpos anti-TrkB (Cell Signaling, *#4603*), Phospho-TRkA/TRkB (Cell Signaling, #4621), anti-mTOR (Cell Signaling, #2983), e PhosPho-mTOR (Cell Signaling, #5536) de acordo com as instruções dos fabricantes.

Amostras contendo entre 30-60mg de proteína, submetidas à imunopreciptação, foram separadas em SDS-PAGE 12% e transferido para membranas de PVDF. Em segida bloqueado com BSA 5% em tampão TBST (20 mM Tris–HCl; 150 mM NaCl; 0.1% Tween20). As membranas foram incubadas com anticorpos anti-TrkB (Cell Signaling, *#4603*) ou Phospho-TRkA/TRkB (Cell Signaling, #4621) ou anti-mTOR (Cell Signaling, #2983) ou PhosPho-mTOR (Cell Signaling, #5536) de acordo com as instruções dos fabricantes overnight, a 4°C, sobre agitação leve. As membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a HRP (1:2000, Santa Cruz, #sc2317). A detecção da atividade cromogênica foi avaliada pelo kit comercial 4CN Plus Chromogenic (Perkin Elmer, #NEL300001EA). As membranas foram digitalizadas e analisadas usando o software ImageJ 1.46 (NIH, USA). Os níveis totais de proteínas foram determinados pelo método de Bradford (Bradford, 1976; Sapan, Lundblad e Price, 1999) e usados para normalizar as amostras.

3.3.7 Dosagem de dos níveis de BDNF (ELISA).

Uma alíquota do tecido triturado foi homogeneizada em 100µL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl; pH 8.0; 137 mM NaCl; 10% glycerol; cocktail inibidor de protease, P2714, Sigma), centrifugado a 10.000g, por 15 min, por 4°C, e o sobrenadante foi coletado. O conteúdo de BDNF foi avaliado utilizando kit de ELISA (BDNF Emax EIA Assay System, Promega), de acordo com metodologia padronizada em nosso grupo e descrita em Sales *et al*.(2011). A concentração das amostras foi calculada com base na curva padrão, construída

com purificado de BDNF humano recombinante. Os níveis de proteínas totais foram determinados pela reação de Bradford (#B6916, Sigma), seguindo o manual de instruções do fabricante, e usadas para normalizar os resultados de BDNF.

3.4 Análise Estatística

As análises comportamentais e moleculares foram comparadas através de ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnets, quando apropriado. Diferenças com $P<0.05$ foram consideradas significativas.

4 DESENHO EXPERIMENTAL

- Experimento 1: Efeitos da administração sistêmica aguda de 5-azaD ou RG-108, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, imediatamente após, foi administrado, em grupos independentes, RG-108 (0,2 ou 0,4 mg/kg), 5-azaD (0,2 ou 04 mg/kg) ou veículo i.p. Após 24 horas, os animais foram submetidos ao teste, que tem duração de 5 min. Os animais foram filmados durante o teste para posterior avaliação do tempo de imobilidade.

- Experimento 2: Efeitos da administração sistêmica aguda de 5-azaD ou RG-108, antes do teste, sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste (15 min) e, 24h depois, ao teste. Uma hora antes do início do teste, foi administrado, em grupos independentes, RG-108 (0,2 ou 0,4mg/kg), 5-azaD (0,2 ou 04 mg/kg) ou veículo i.p. Os animais foram filmados durante o teste para posterior avaliação do tempo de imobilidade.

- Experimento 3: Efeitos da administração sistêmica de 5-azaD ou RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do campo aberto. Os animais receberam administração da dose efetiva no nado forçado de RG-108 (0,2 mg/kg), 5-azaD (0,2 mg/kg) ou veículo i.p., em grupos independentes, uma hora antes do inicio do teste. No momento do teste os animais foram expostos à arena por 30s para habitação. Em seguida iniciou-se teste do campo aberto que foi registrado por meio de filmagem para posterior analise.

- Experimento 4: Efeito da administração local de BDNF (0,1nmol ou 0,2nmol) no CPFMv de animais submetidos ao nado forçado. Os animais foram submetidos à cirurgia esteriotáxica para implantação de cânula no CPFMv (conforme descrito no tópico 4.3.3). Após cinco a sete dias da realização da cirurgia, os animais foram submetidos ao pré-

teste (15 min). Os animais foram em seguida divididos em grupos independentes e receberam a administração intra-CPFMv de BDNF (0,1 ou 0,2 nmol) ou veículo, 30 minutos antes do teste. Os animais foram submetidos à sessão teste, 24 horas após a realização do pré-teste, a qual tem duração de 5 min. Os animais foram filmados durante o teste para posterior avaliação do tempo de imobilidade. Após o teste os animais tiveram os encéfalos retirados para posterior realização da localização do sítio de injeção.

- Experimento 5: Efeitos da administração de BDNF (0,2nmol) intra-CPFmv sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do campo aberto. Os animais receberam injeção da maior dose efetiva no nado forçado de BDNF (0,2 nmol), veículo, em grupos independentes, 30 minutos antes do inicio do teste. No momento do teste os animais foram expostos à arena por 30s para habituação. Em seguida iniciou-se teste do campo aberto que foi registrado por meio de filmagem para posterior analise.

- Experimento 6: Bloqueio do efeito da administração intra-CPFmv BDNF (0,2 nmol), pela administração de K252a (0,01nmol) no CPFMv de animais submetidos ao nado forçado. Os animais foram submetidos à cirurgia esteriotáxica para implantação de cânula no CPFMv (conforme descrito no tópico 4.3.3). Após cinco a sete dias da realização da cirurgia, os animais foram submetidos ao pré-teste (15 min). Os animais foram divididos em grupos independentes e receberam a administração intra-CPFMv de K252a (0,01 nmol) ou veículo, 40 minutos antes do teste. Após 10 minutos da primeira administração intra-CPFmv esses animais foram subdivididos em grupos independentes para realização da injeção intra-CPFmv de BDNF (0,2nmol) ou veículo. Após 30 minutos da última administração os animais foram submetidos à sessão teste, 24 horas após a realização do pré-teste, a qual teve duração de 5 min. Os animais foram filmados durante o teste para posterior avaliação do tempo de imobilidade. Após o teste os animais tiveram os encéfalos retirados para posterior realização da localização do sítio de injeção.

- Experimento 7: Bloqueio do efeito da administração intra-CPFmv BDNF (0,2 nmol), pela administração de Rapamicina (0,2 nmol) no CPFMv de animais submetidos ao nado forçado. Os animais foram submetidos à cirurgia esteriotáxica para implantação de cânula no CPFMv. Após cinco a sete dias da realização da cirurgia, os animais foram submetidos ao pré-teste (15 min). Os animais foram divididos em grupos independentes e receberam a administração intra-CPFMv de Rapamicina (0,2nmol) ou veículo, 40 minutos antes do teste. Após 10 minutos da primeira administração intra-CPFmv esses animais foram subdivididos em grupos independentes para realização da injeção intra-CPFmv de BDNF (0,2nmol) ou veículo. Após 30 minutos da última administração os animais foram submetidos à sessão teste, 24 horas após a realização do pré-teste, a qual teve duração de 5 min. Os animais foram filmados durante o teste para posterior avaliação do tempo de imobilidade. Após o teste os animais tiveram os encéfalos retirados para posterior realização da localização do sítio de injeção.

- Experimento 8: Efeito da administração sistêmica de RG-108 concomitantemente com a injeção local de K252a ou Rapamicina no CPFMv de animais submetidos ao nado forçado. Os animais foram submetidos à cirurgia esteriotáxica para implantação de cânula no CPFMv. Após cinco a sete dias da realização da cirurgia, os animais foram submetidos ao pré-teste (15 min). Os animais foram em seguida divididos em grupos independentes e receberam a administração intra-CPFMv de K252a (0,01nmol), Rapamicina (0,2nmol) ou veículo, 1 hora antes do teste. Esses animais foram subdivididos em grupos independentes que receberam injeção de RG108 (0,2mg/kg) ou veículo, imediatamente após a injeção intra-CPFMv. Os animais foram submetidos a sessão teste, 24 horas após a realização do pré-teste, a qual tem duração de 5 min. Os animais foram filmados durante o teste para posterior avaliação do tempo de imobilidade. Após o teste os animais tiveram os encéfalos retirados para posterior realização da localização do sítio de injeção.

- Experimento 9: Efeitos da administração sistêmica aguda de RG-108 sobre o perfil de metilação global no CPFmv de animais submetidos ao modelo do nado forçado. Nesse experimento os animais foram submetidos a sessão pré-teste de 15 minutos do nado forçado. Após 23 horas os animais receberam a administração de RG108 (0,2mg/kg) intraperitoneal ou DMSO 10%. Uma hora após a administração os animais foram decapitados para dissecção do CPFmv. As amostras de CPFmv foram homogeneizadas em tampão de lise (Tris HCl 20mM; glicerol 10% e NaCl 0,9%).

O DNA foi extraído utilizando AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, USA) de; acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi digerido com Nuclease P1 (# P2640, Sigma) e com fosfatase alcalina (# N8630, Sigma). Em seguida o DNA digerido foi precipitado, e o DNA metilado foi quantificado usando DNA Methylation EIA kit (# 589324, Cayman Chemicals), de acordo com as instruções do fabricante. A medida de absorbância foi realizada utilizando leitor de placas VictorX3 e software (Perkin Elmer). Várias concentrações de purificada 5-metil-2'- desoxicitidina (fornecido pelo kit) foram utilizados para construção da curva padrão. A concentração da amostra (ng · mL-1) foi calculado com base em 4 parâmetros equação logística de curva padrão.

- Experimento 10: Efeitos da administração sistêmica aguda de RG-108 sobre o perfil de expressão gênica no CPFmv de animais submetidos modelo do nado forçado. Nesse experimento os animais foram submetidos a sessão pré-teste de 15 minutos do nado forçado. Após 23 horas os animais receberam a administração de RG108 (0,2mg/kg) intraperitoneal ou DMSO 10%. Uma hora após a administração os animais foram decapitados para dissecção do CPFmv. As amostras de CPFmv foram homogeneizadas em tampão de lise (Tris HCl 20mM; glicerol 10% e NaCl 0,9%) adicionado de inibidor de protease (10% v/v tampão de lise),

inibidores de fosfatase (1% v/v tampão de lise) e ortovanadato de sódio (2mM no tampão de lise).

A quantificação da expressão e ativação do receptor TRkB foi realizada pela técnica de *wetern blotting* por meio dos anticorpos *TRkB (#80E3) Cell Signaling* e *Phospho-TRkA/TRkB(#4621) Cell Signaling*, respectivamente, de acordo com as indicações do fabricante. Ainda nessas amostras foi analisado a expressão e ativação da enzima mTOR pela técnica de *western blot* usando os seguintes anticorpos *mTOR (#7C10) Cell Signaling e PhosphomTOR (#5536) Cell Signaling* de acordo com as indicações do fabricante. Os níveis totais de proteínas foram determinados pelo método de Bradford (Bradford, 1976; Sapan *et al* 1999) e usados para normalizar as amostras.

- Experimento 11: Efeitos da administração sistêmica aguda de RG-108 sobre os níveis de BDNF no CPF de animais submetidos ao modelo do nado forçado. Nesse experimento os animais foram submetidos a sessão pré-teste de 15 minutos do nado forçado. Após 23 horas os animais receberam a administração de RG108 (0,2mg/kg) intraperitoneal ou DMSO 10%. Uma hora após a administração os animais foram decapitados para dissecção do CPF. As amostras de CPF foram homogeneizadas em tampão de lise (Tris HCl 20mM; glicerol 10% e NaCl 0,9%). A dosagem de BDNF foi realizada pelo *Kit BDNF* E_{max} *ImunnoAssay System (Promega G7610)*, segundo as indicações do fabricante. A concentração das amostras foi calculada com base na curva padrão, construída com BDNF recombinante humano purificado. Os níveis totais de proteínas foram determinados pelo método de Bradford (Bradford, 1976; Sapan *et al* 1999) e usados para normalizar as amostras.

5 RESULTADOS

Experimento 1: Efeitos da administração sistêmica aguda de RG-108 ou 5-azaD, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

A administração sistêmica aguda de RG-108, imediatamente após o pré-teste, promove efeito tipo antidepressivo nas doses de 0,2 e 0,4 mg/kg em animais submetidos ao teste do nado forçado ($F_{3,15}=8,918$; $p<0,05$; n=4-6), efeito esse, evidenciado pela redução do tempo de imobilidade (Figura 1). A administração sistêmica aguda de 5-azaD, imediatamente após o pré-teste (Figura 2), promove efeito tipo antidepressivo na dose de 0,2mg/kg em animais submetidos ao teste do nado forçado ($F_{3,34}=5,997$; $p<0,05$; n=9-10).

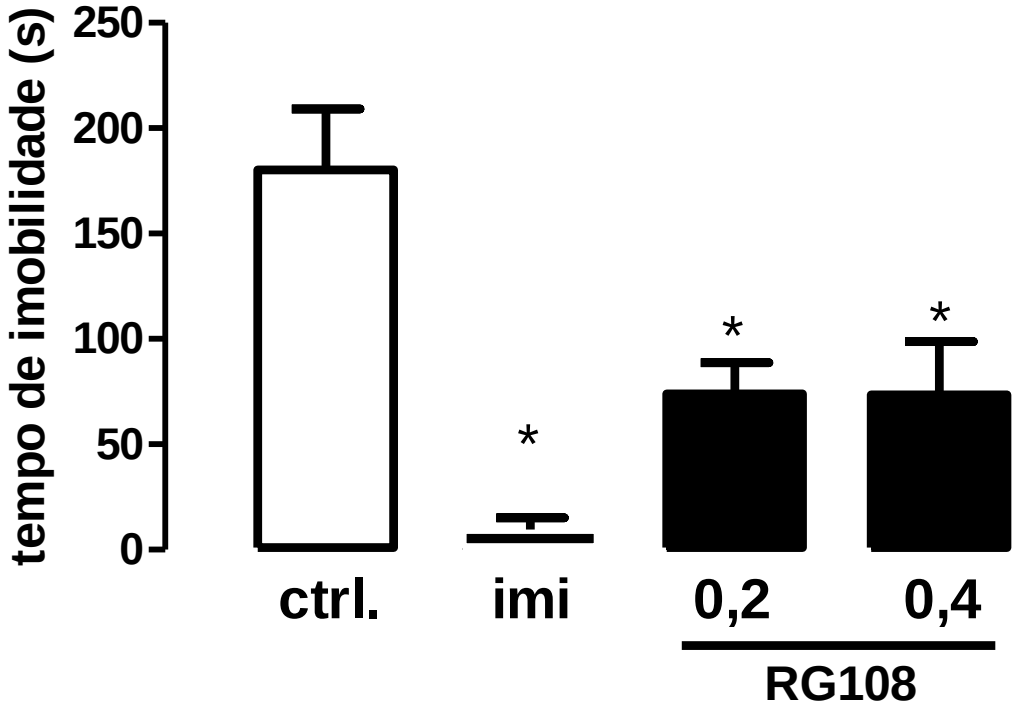

Figura 1. Efeitos do tratamento com RG 108, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste e imediatamente depois receberam injeção ip de RG-108 (0,2 e 0,4 mg/kg), n =4-6. Dados representam a média +/-EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

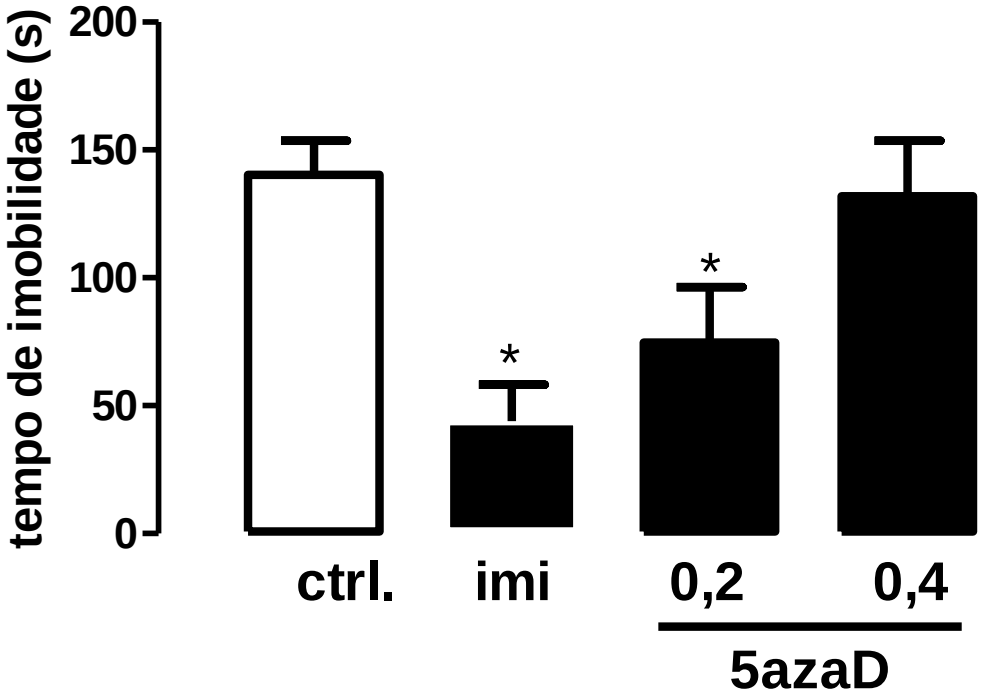

Figura 2. Efeitos do tratamento com 5azaD, imediatamente após o pré-teste, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste e imediatamente após, receberam injeção ip de 5azaD (0,2 e 0,4 mg/kg), n =9-10. Dados representam a média +/-EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 2: Efeitos da administração sistêmica aguda de RG-108 ou 5-azaD, antes do teste, sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do nado forçado.

A administração sistêmica aguda de RG-108, uma hora antes do teste, promove efeito tipo antidepressivo apenas na dose de 0,2 mg/kg em animais submetidos ao teste do nado forçado ($F_{3,12}=14,11$; $p<0,05$; n=4), efeito esse, evidenciado pela redução do tempo de imobilidade (Figura 3). A administração sistêmica aguda de 5azaD, uma hora antes do teste, promove efeito tipo antidepressivo nas doses de 0,2 e 0,4mg/kg, em animais submetidos ao teste do nado forçado ($F_{3,35}= 7,505$; $p<0,05$; n=7-11), efeito esse, evidenciado pela redução do tempo de imobilidade (Figura 4).

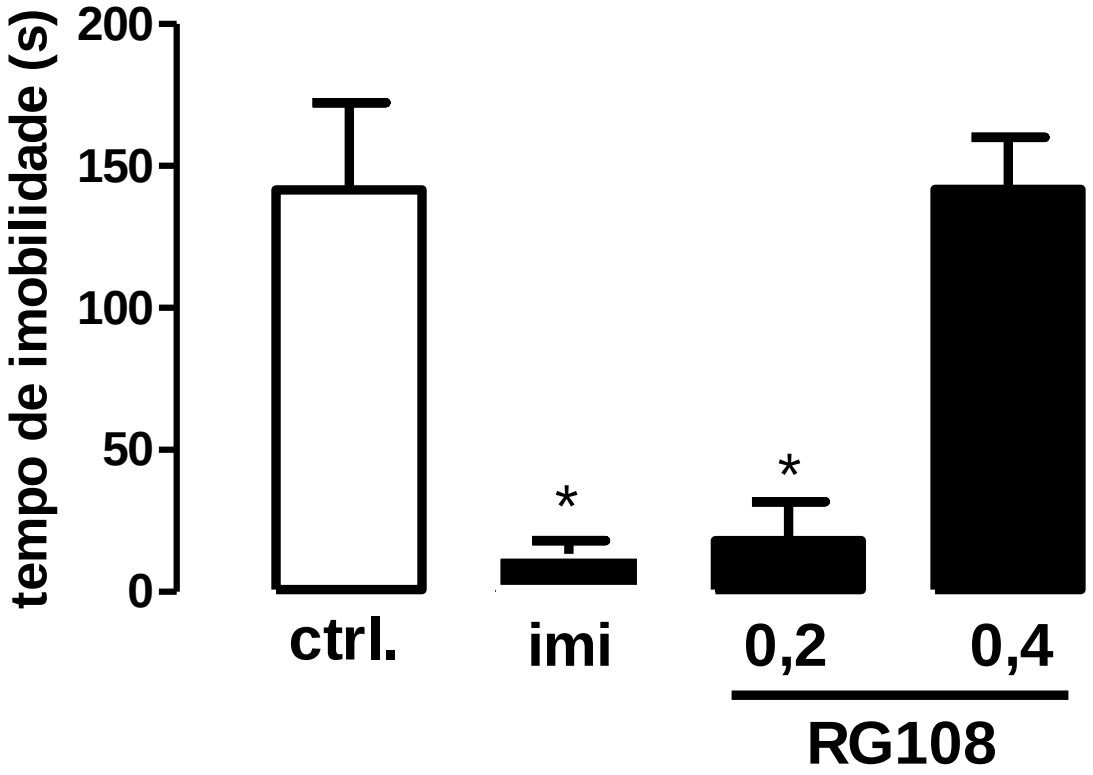

Figura 3. Efeitos do tratamento com RG 108, uma hora antes do teste, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste e uma hora antes do teste, receberam a injeção ip de RG-108 (0,2 e 0,4 mg/kg), n =4. Dados representam a média +/-EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

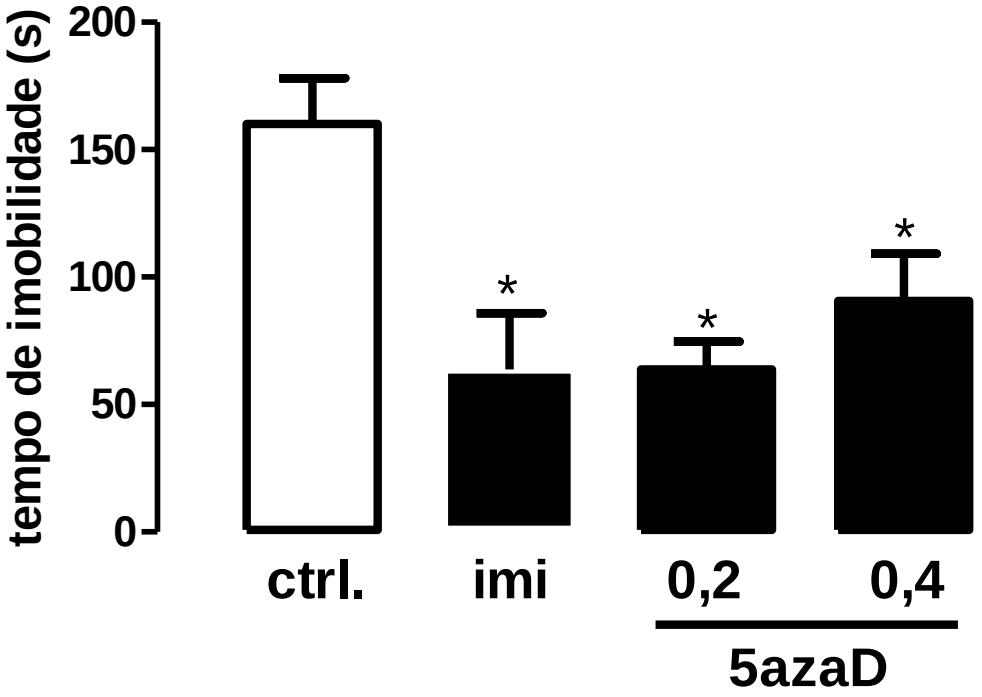

Figura 4. Efeitos do tratamento com 5-Aza, uma hora antes do teste, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do nado forçado. Os animais foram submetidos ao pré-teste, uma hora antes do teste, receberam a injeção ip de 5-azaD (0,2 e 0,4 mg/kg), n = 7-11. Dados representam a média +/-EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 3: Efeitos da administração sistêmica de RG108 sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste do campo aberto.

A administração sistêmica aguda de RG108, uma hora antes do teste, não promove alteração na atividade locomotora na dose de 0,2mg/kg, em animais expostos ao teste do campo aberto ($F_{1,10}$= 0,997; $p<0,05$; n=5; Figura 5). A administração sistêmica aguda de 5azaD, uma hora antes do teste, não promove alteração na atividade locomotora na dose de 0,2mg/kg, em animais expostos ao teste do campo aberto ($F_{1,10}$= 0,999; $p<0,05$; n=6; Figura 6).

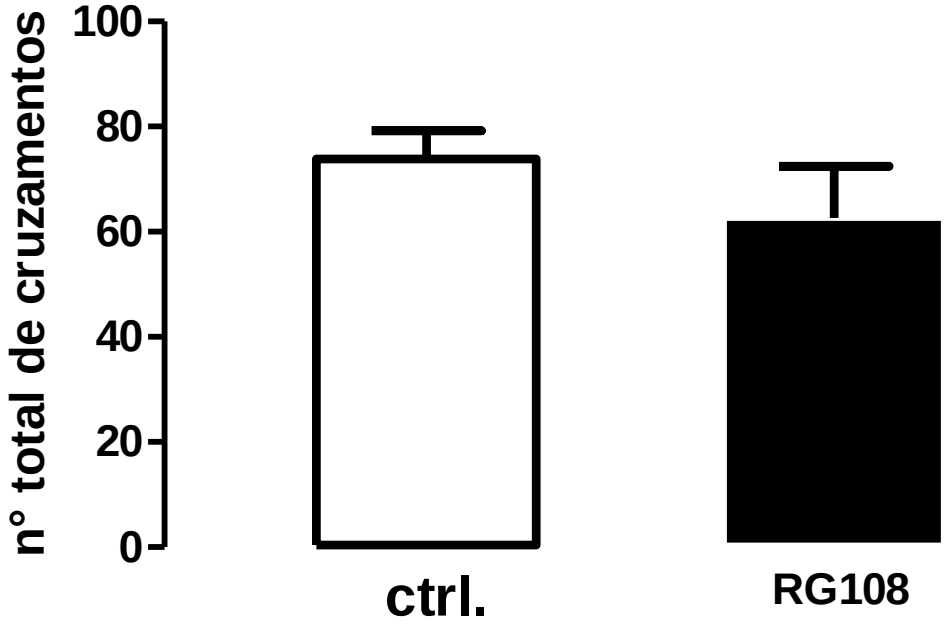

Figura 5. Efeitos do tratamento com RG 108, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do campo aberto. Os animais receberam injeção ip de RG-108 (0,2 mg/kg), uma hora antes do inicio do teste, n =5.Dados representam a média +/- EPM;*P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

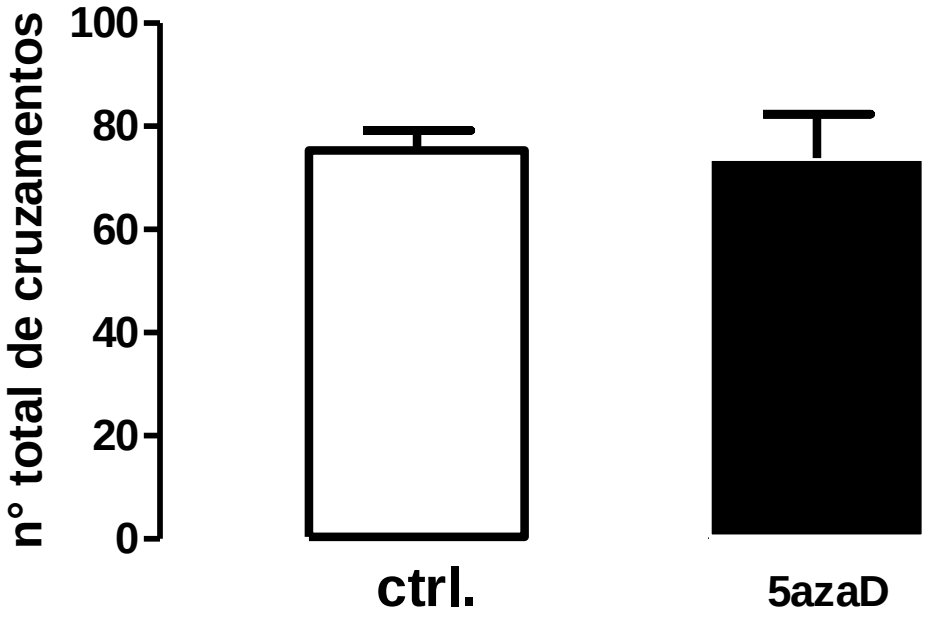

Figura 6. Efeitos do tratamento com 5-AzaD, sobre o comportamento de animais submetidos ao teste do campo aberto. Administração sistêmica aguda de 5-azaD (0,2mg/kg), n =6. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 4: Efeito da administração local de BDNF (0,1nmol ou 0,2nmol) no CPFMv de animais submetidos ao nado forçado.

A administração intra-CPFmv de BDNF, 30 minutos antes do teste, promove efeito tipo antidepressivo apenas nas doses de 0,1 e 0,2nmol/0,2ul, em animais submetidos ao teste do nado forçado ($F_{2,15}$= 21,67; $p<0,05$; n=7), efeito esse, evidenciado pela redução do tempo de imobilidade (Figura 7).

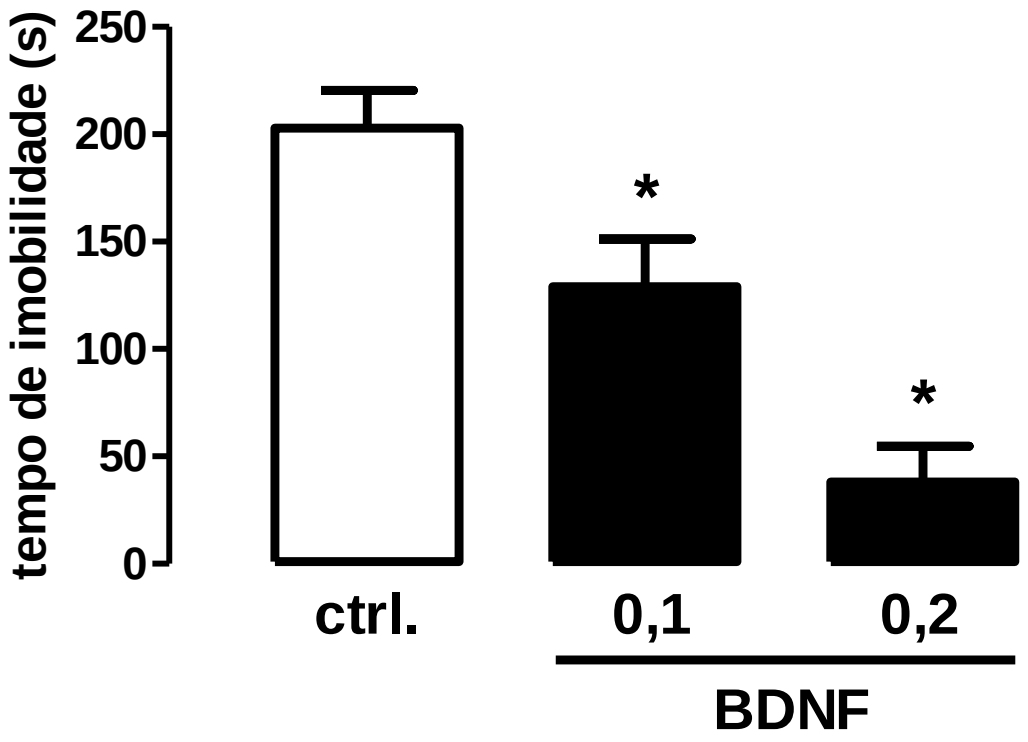

Figura 7. Efeitos do tratamento com BDNF, 30 minutos antes do teste, em animais submetidos ao teste do campo aberto. Administração intra-CPFmv de BDNF (0,1 e 0,2 nmol), n =7. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 5: Efeitos da administração local de BDNF (0,2nmol) no CPFMv de animais submetidos ao teste do campo aberto.

A administração intra-CPFmv de BDNF, 30 minutos antes do teste, não promove alteração na atividade locomotora na concentração de 0,2nmol/0,2ul, em animais expostos ao teste campo aberto ($F_{1,11}=0,9996$; $p<0,05$; n=8-10), figura 8.

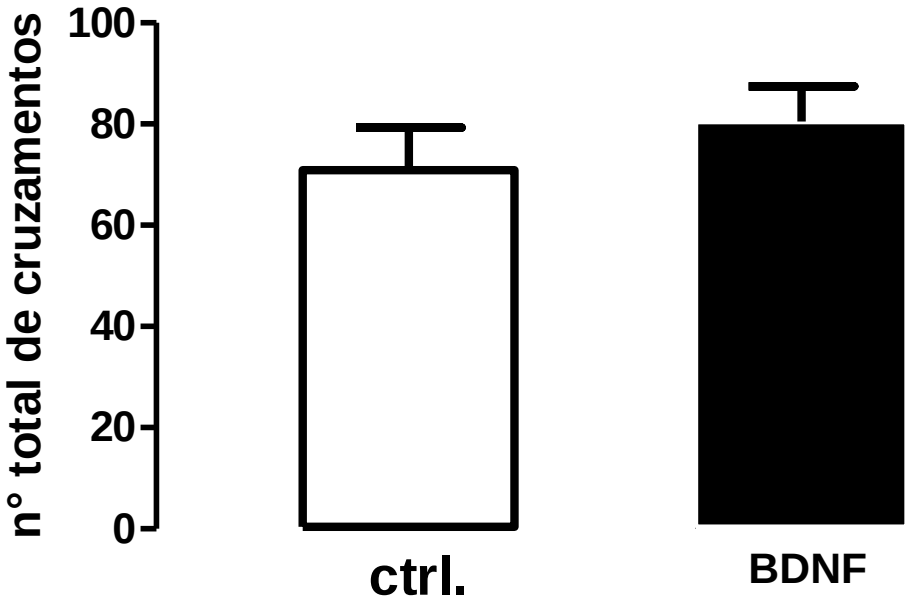

Figura 8. Efeitos do tratamento com BDNF, 30 minutos antes do teste, em animais submetidos ao teste do campo aberto. Administração intra-CPFMv de BDNF (0,2nmol/0,2µl), n=8-10. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 6: Bloqueio do efeito da administração intra-CPFmv BDNF (0,2 nmol), pela administra de K252a (0,01nmol) no CPFMv de animais submetidos ao nado forçado.

A administração de K252a (0,01nmol/0,2ul) intra-CPFmv, 40 minutos antes do teste, bloqueia o efeito tipo antidepressivo induzido pela administração de rhBDNF, 30 minutos antes do teste (0,2nmol/0,2ul), em animais submetidos ao teste do nado forçado (F3,24= 4,332; n=6-8; p<0,05) (Figura 9). A dose de 0,01nmol de K252a, administrada intraCPFmv, per se não tem efeito no teste do nado forçado.

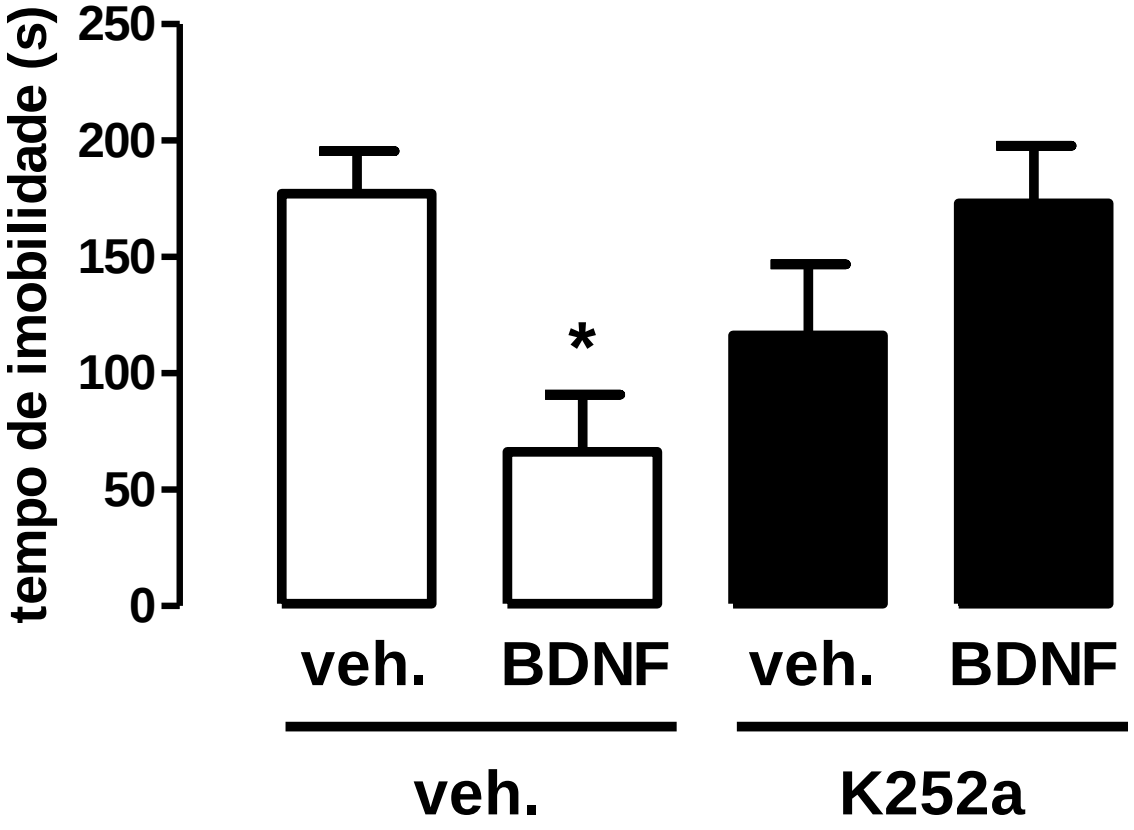

Figura 9. Efeito da administração intra-CPFmv de K252a (0,01nmol/0,2µl), 40 minutos antes do teste, seguida pela administração intra-CPFmv de rhBDNF (0,2nmol/0,2µl), 30 minutos antes do teste do nado forçado (n=6-8). Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pósteste de Dunnets).

Experimento 7: Bloqueio do efeito da administração intra-CPFmv BDNF (0,2 nmol), pela administra de Rapamicina (0,2 nmol) no CPFmv de animais submetidos ao nado forçado.

A administração de Rapamicina (0,2nmol/0,2ul) intra-CPFmv, 40 minutos antes do teste, bloqueia o efeito tipo antidepressivo induzido pela administração de rhBDNF, 30 minutos antes do teste (0,2nmol/0,2ul), em animais submetidos ao teste do nado forçado ($F_{3,25}=29,03$; n=6-8; $p<0,05$) (Figura 10). A dose de 0,2nmol de Rapamicina, administrada intra-CPFmv, per se não tem efeito tipo antidepressivo no teste do nado forçado.

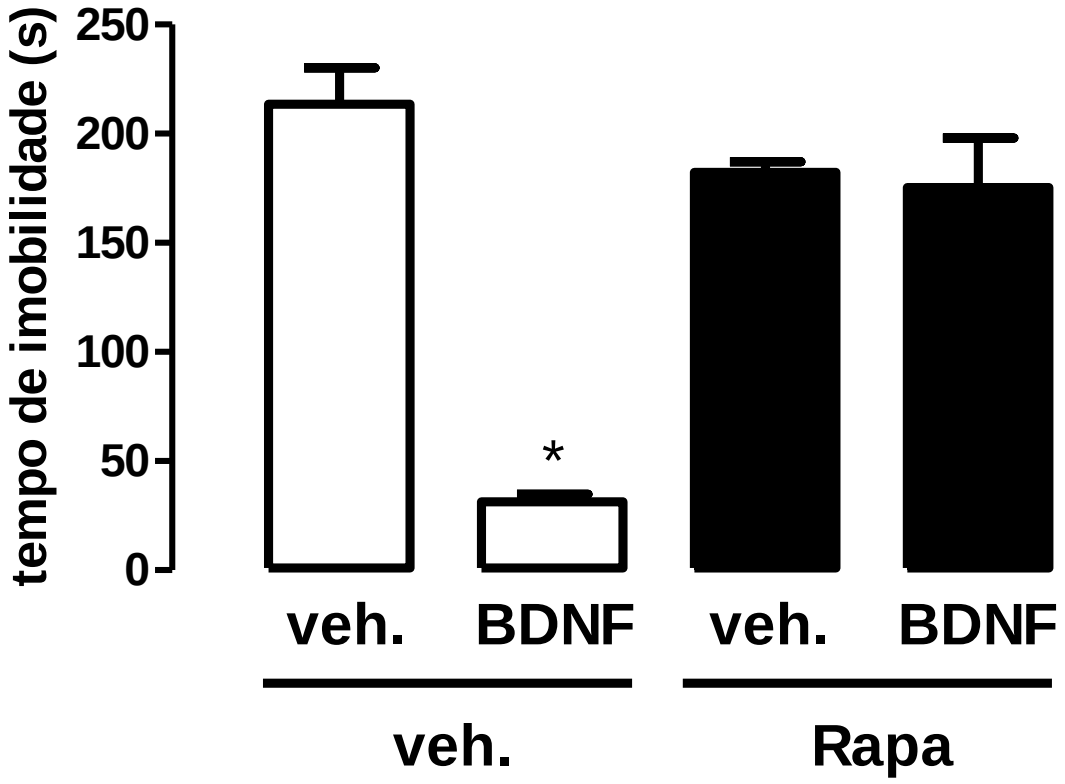

Figura 10. Efeito da administração intra-CPFmv de Rapamicina (0,2nmol/0,2µl), 40 minutos antes do teste, seguida pela administração intra-CPFmv de rhBDNF (0,2nmol/0,2µl), 30 minutos antes do teste do nado forçado, n=6-8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 8: Efeito da administração sistêmica de RG-108 concomitantemente com a injeção local de K252a ou Rapamicina no CPFMv de animais submetidos ao nado forçado.

A administração de K252a ou Rapamicina (0,01nmol/0,2ul e 0,2nmol/0,2ul, respectivamente) intra-CPFmv, 1 hora antes do teste, bloqueia o efeito tipo antidepressivo induzido pela administração sistêmica de RG108 (0,2mg/kg), 1 hora antes do teste, em animais submetidos ao teste do nado forçado ($F_{3,24}=5,161$; $p<0,05$; n=7) (Figura 11).

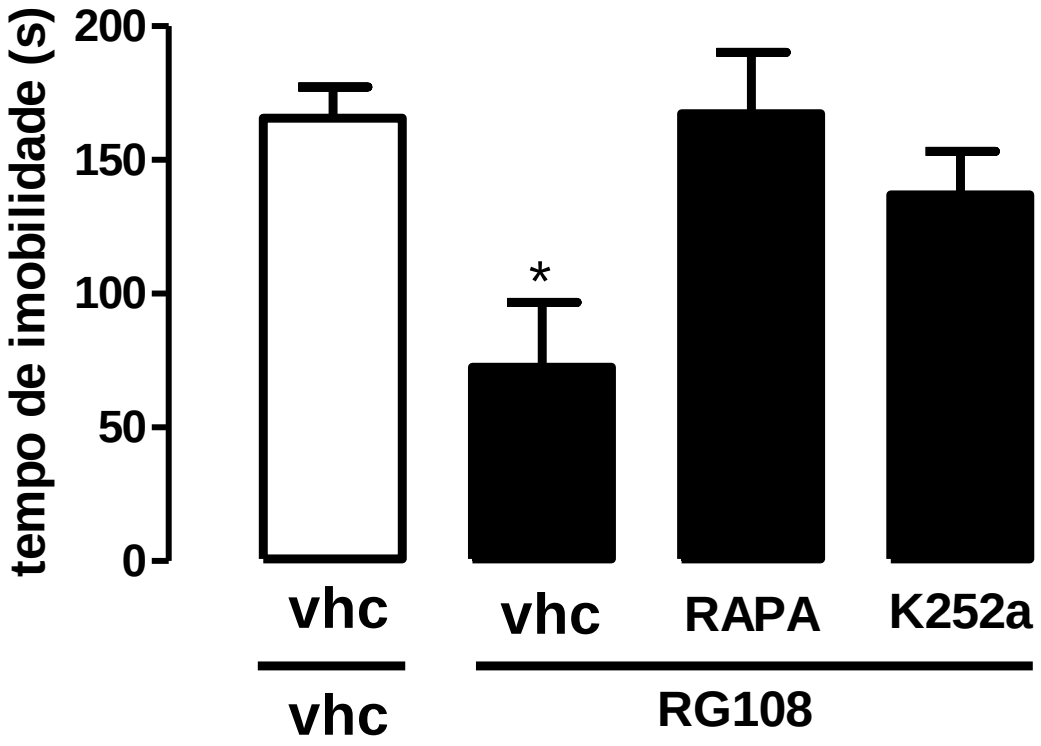

Figura 11. Efeito da administração intra-CPFmv de K252a (0,01nmol/0,2µl) ou Rapamicina (0,2nmol/0,2µl), uma hora antes do teste, seguida pela administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), n=7. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 9: Efeitos da administração sistêmica aguda de RG-108 sobre o perfil de metilação global no CPFmv de animais submetidos ao modelo do nado forçado.

A administração sistêmica aguda de RG-108 (0,2 mg/kg), uma hora antes da dissecção, não altera o perfil de metilação no CPFmv de animais expostos ao estresse do nado forçado (Figura12; F2,23=0,738).

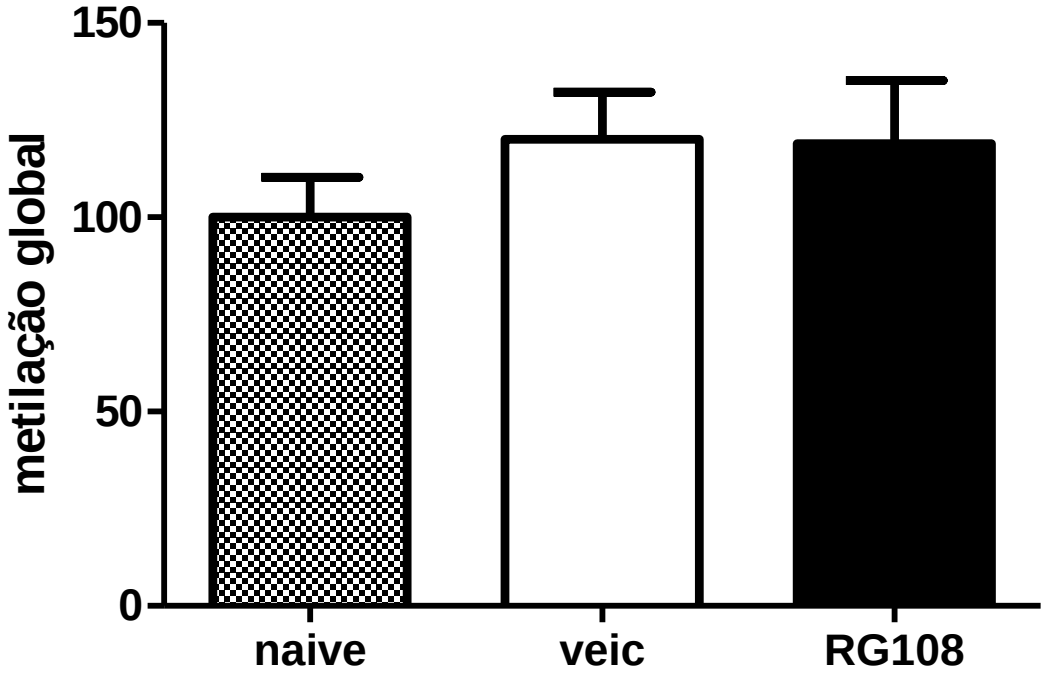

Figura 12. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre o perfil de metilação global do CPFmv, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 10: Efeitos da administração sistêmica aguda de RG-108 sobre o perfil de expressão gênica no CPFmv de animais submetidos modelo do nado forçado.

A administração sistêmica aguda de RG-108 (0,2 mg/kg), uma hora antes da dissecção não altera a expressão do receptor TrKB em animais expostos ao estresse do nado forçado (Figura 13; $F_{2,20}=1,822$;$p<0,05$ n=6-8). Com relação a ativação do receptor TrkB, foi observado uma diminuição da fosforilação do resíduo 706/707 em animais expostos ao estresse do nado forçado. Entretanto a administração de RG-108 não foi capaz de reverter essa redução nos níveis de receptor TrkB fosforilado (Figura 14; $F_{2,19}=3,781$; $p<0,05$).

Da mesma forma, a administração sistêmica aguda de RG-108 (0,2 mg/kg), uma hora antes da dissecção não altera expressão da enzima mTOR (Figura 15; $F_{2,23}=0,214$; $p<0,05$; n=8). Nesse caso também não foi observado alteração na ativação da mTOR, já que os níveis de proteína fosforilada não sofreu variação com a exposição ao estresse, nem mesmo pelo tratamento.(Figura16, $F_{2,18}=0,223$; $p<0,05$).

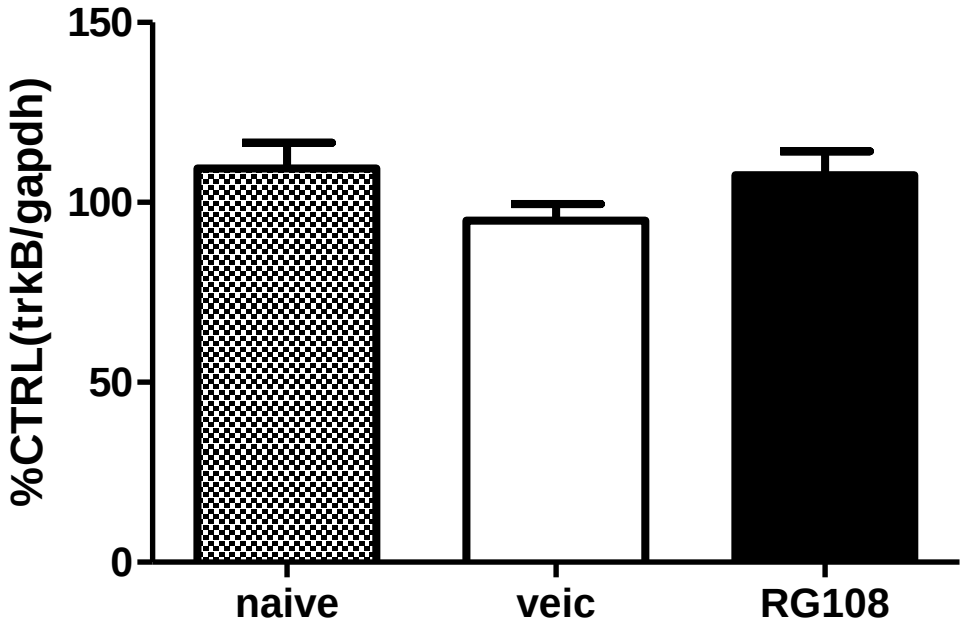

Figura 13. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre a expressão do receptor TrkB, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=6-8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

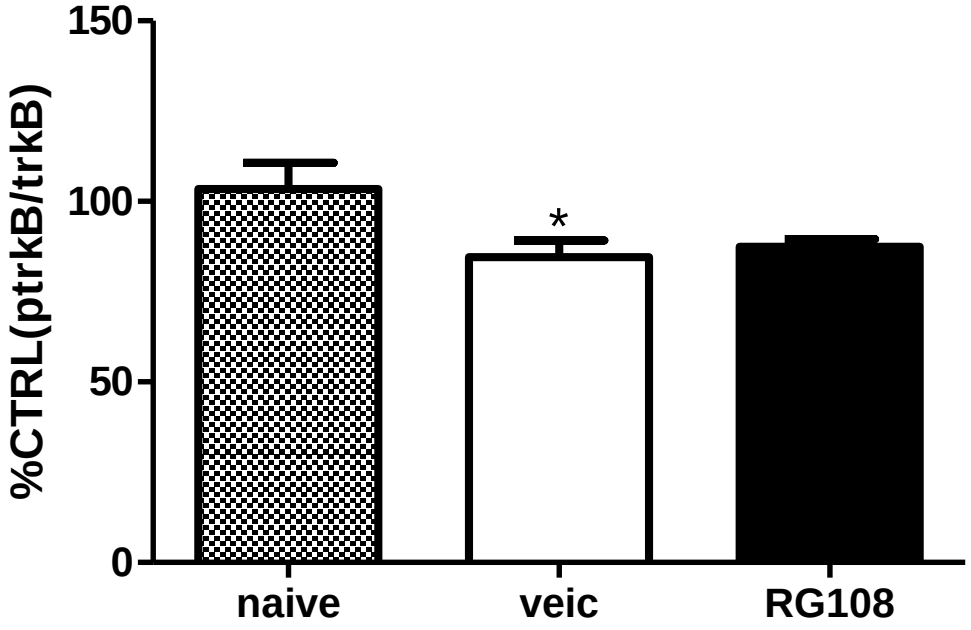

Figura 14. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre a fosforilação do receptor TRkB, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=6-7. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

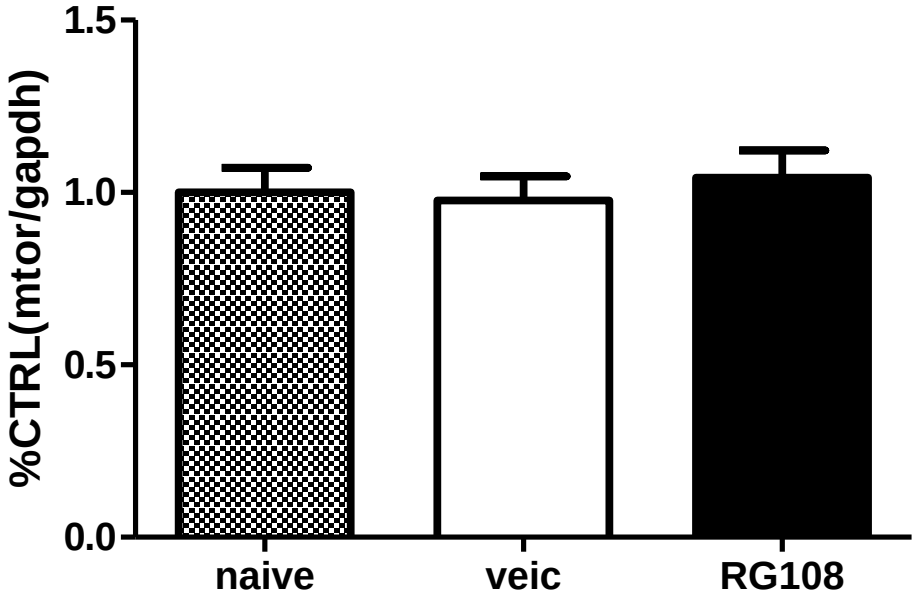

Figura 15. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre a expressão da enzima mTOR, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

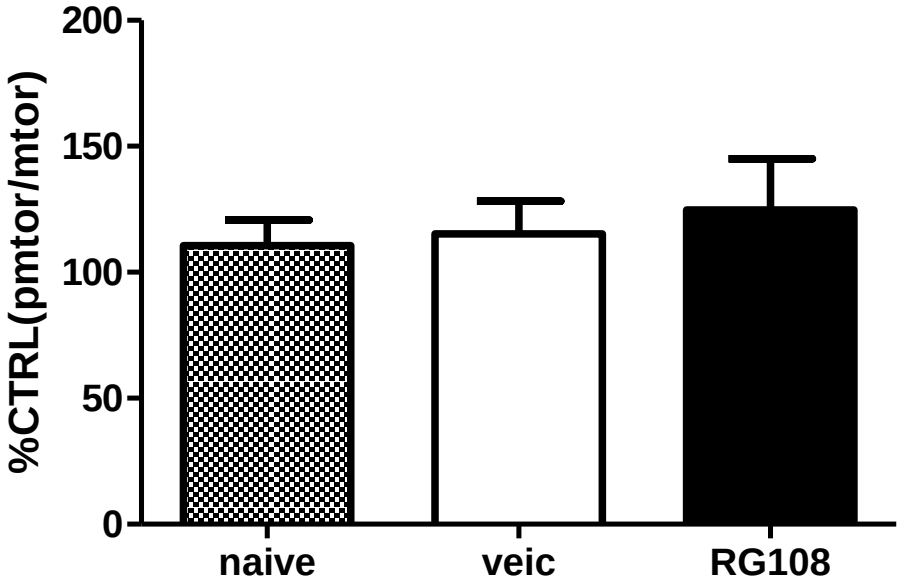

Figura 16. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre a fosforilação da enzima mTOR, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=6-7. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

Experimento 11: Efeitos da administração sistêmica aguda de RG-108 sobre os níveis de BDNF no CPF de animais submetidos ao modelo do nado forçado.

A administração sistêmica aguda de RG-108 (0,2 mg/kg), uma hora antes da dissecção, não altera os níveis de BDNF no CPF de animais expostos ao estresse do nado forçado (Figura17; F2,21=0,528; p<0,05, n=6-8).

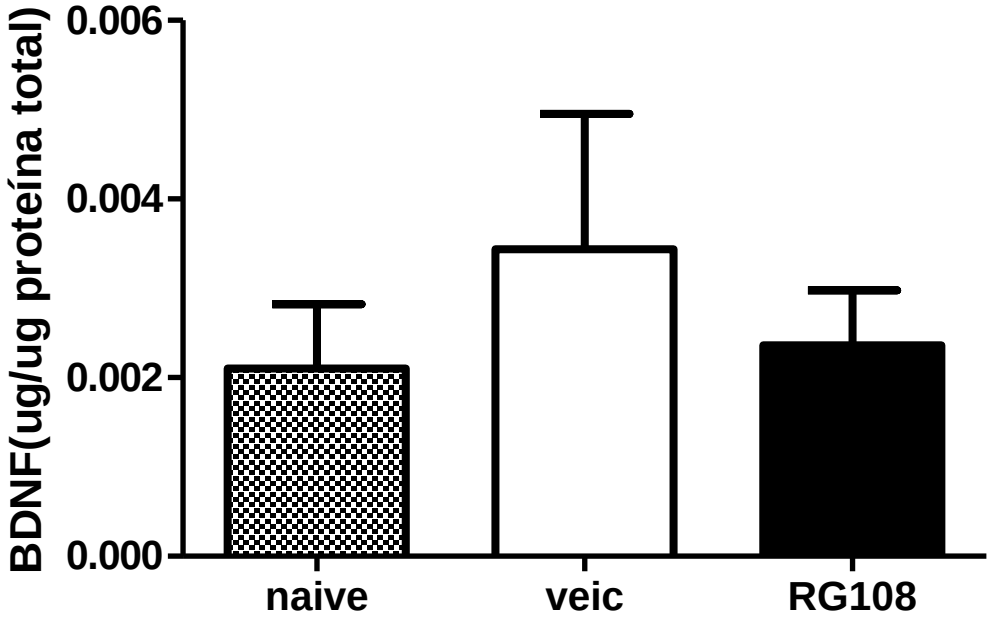

Figura 17. Efeito da administração sistêmica aguda de RG108(0,2mg/kg), sobre os níveis de BDNF do CPF, uma hora antes da dissecção, em animais submetidos ao estresse do nado forçado. n=6-8. Dados representam a média +/- EPM; *P<0.05 (ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnets).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a administração sistêmica aguda dos inibidores da metilação do DNA, RG108 e 5azaD, reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Além disso, esse efeito foi bloqueado pela administração intra-CPFmv de K252a, antagonista de receptores TRk, e da Rapamicina, inibidor da enzima mTOR. Ainda demonstramos que, a administração intra-CPFmv de BDNF promove a redução do tempo de imobilidade no teste do nado forçado, efeito esse que também foi prevenido pela administração intra-CPFmv de K252a ou Rapamicina. Esse conjunto de resultados indica que o CPFmv participa da resposta tipo antidepressiva promovida pelo inibidor da metilação do DNA, o RG108, e que esse efeito é dependente da via BDNF-TRkB-mTOR local.

O nado forçado é amplamente utilizado como modelo preditivo de efeito antidepressivo. Este se baseia na observação de que ratos colocados em um cilindro com água sem possibilidade de sair assumem um perfil de imobilidade e o tratamento com antidepressivos é capaz de reduzir o tempo em posição imóvel (Porsolt, Lepichon e Jalfre, 1977; Porsolt, Bertin e Jalfre, 1978). Esse teste, assim como os demais modelos animais de depressão, se baseia na avaliação de uma consequência comportamental decorrente da exposição a evento estressante e drogas antidepressivas são capazes de reverter tais consequências (Porsolt, Lepichon e Jalfre, 1977). Em modelos como o nado forçado, estimulantes psicomotores podem alterar a atividade locomotora levando a resultados falso-positivos. Por isso, realizamos experimentos adicionais com grupos independentes de animais que receberam as doses efetivas no nado forçado, mas foram submetidos ao teste do campo aberto, a fim de nos certificarmos que os resultados encontrados no presente trabalho não seriam decorrentes do aumento inespecífico da locomoção do animal. Dessa forma, nossos resultados mostraram que as doses de RG108 e 5-azaD que promoveram efeito tipo

antidepressivo no nado forçado não alteram a atividade locomotora nos 5 minutos de exposição ao campo aberto. Assim, esse resultado reforça a validade do efeito tipo antidepressivo dos inibidores da metilação do DNA, descartando a possibilidade de efeito secundário a mudança comportamental locomotora.

Nesse trabalho utilizamos dois inibidores da metilação do DNA, que apresentam mecanismos de ação diferentes. O 5-azaD é um inibidor da metilação do DNA do tipo nucleosídeo, ou seja, é uma molécula análoga a citosina presente no DNA. A molécula de 5azaD é fosforilada e incorporada ao DNA onde é reconhecida pelas DNMTs. Uma vez que ocorre essa ligação da DNMT a molécula de 5azaD a enzima não é capaz de promover a adição do grupamento metil a estrutura do DNA, o que impede a atividade de silenciamento gênico promovido por essas enzimas (Oki et al, 2006). Por outro lado o RG108 é um inibidor das DNMTs do tipo não nucleosídico. Essa molécula foi sintetiza em laboratório, e empregada na inibição das DNMTs com base em técnicas de modelagem molecular bastante avançada. A molécula de RG108 se liga ao domínio catalítico das DNMTs e impede a ligação enzima aos pontos de metilação do DNA (Brueckner *et al.*, 2005). Em 2010, Nestler e colaboradores observaram que a administração repetida (10 dias) de RG108 intra-núcleo acumbes promovia efeito tipo antidepressivo no modelo de derrota social. Em outro estudo, esses autores demonstraram que animais geneticamente modificados para super expressar a proteína G, proteína conhecidamente relacionada ao favorecimento da metilação do DNA, apresentavam menor taxa de fosforilação do receptor TRkB no núcleo acumbes quando comparados a animais controle (Laplant *et al.*, 2010). Nesse sentido, resultados do nosso grupo de pesquisa indicaram que da administração sistêmica 5-azaD, induz efeito tipo-antidepressivo, dose-dependente, no modelo animal do nado forçado em ratos (Sales *et al.*, 2011). Nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que tal efeito era acompanhado de diminuição global da metilação do DNA e aumento da expressão de BDNF no hipocampo. Essas

evidências corroboram a hipótese desse trabalho que sugere a participação da via BDNF-TRkB-mTOR no efeito antidepressivo dos inibidores da metilação do DNA.

Existem inúmeras evidências de que o tratamento crônico com antidepressivos induz alterações plásticas neuronais em diferentes estruturas límbicas, as quais são dependentes de alterações na expressão gênica, provavelmente como uma tentativa de atenuar efeitos induzidos pelo estresse (Koponen *et al.*, 2005; Duman e Monteggia, 2006; Krishnan e Nestler, 2008). Com base nessas evidências uma nova hipótese para explicar a neurobiologia da depressão foi proposta, a "Hipótese Neurotrófica (ou molecular) da Depressão", a qual está fundamentada principalmente na observação de que a exposição ao estresse diminui a expressão de BDNF e induz atrofia apical dendrítica, particularmente no hipocampo e no córtex pré-frontal, mudanças neuroplásticas que podem ser atenuadas pelo tratamento crônico com antidepressivos (Koponen *et al.*, 2005; Duman e Monteggia, 2006; Krishnan e Nestler, 2008). Sabe-se ainda que, o tratamento crônico com antidepressivos aumenta a expressão de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo e o bloqueio da expressão de BDNF ou da neurogênese hipocampal impede o aparecimento do efeito antidepressivo em modelos animais (Saarelainen *et al.*, 2003; Adachi *et al.*, 2008).

A molécula de BDNF é inicialmente sintetizada no retículo endoplasmático, onde é convertido de pré-proteína em pró-neurotrofina. Nas vesículas secretoras do complexo de Golgi essas pró-neurotrofinas são dimerizadas e proteoliticamente processadas para posterior liberação na forma madura, que é conhecida como BDNF propriamente dito (Lessmann e Brigadski, 2009). O BDNF promove suas ações por meio da ligação a um receptor do tipo tirosina quinase, o receptor TRkB. Existem três tipos de receptores TRK, sendo eles TRkA, TRkB e TRkC. Todos eles são receptores transmembrana que possuem um domínio tirosina quinase intracelular e um domínio extracelular que é específico para ligação de diferentes famílias de neurotrofina (Barbacid, 1995; Huang e Reichardt, 2003). A sinalização por TRkB

ocorre através de três principais vias mediadas por tirosina quinase: a via MAPK-ERK, a via da fosfolipase Cγ1 (PLCγ1)-PKC e a via da PI3K-AKT-mTOR. Os efeitos provocados por estas vias de sinalização predominantemente promovem a sobrevivência e diferenciação celular (Huang e Reichardt, 2003). Estudos recentes mostraram que o composto 7,8DHF (7,8 dihidroxiflavona), que induz a fosforilação do receptor TRkB, é capaz de inibir a morte neuronal in vitro, com eficiência muito parecida a do próprio BDNF, sendo essa atividade bloqueada por K252a , antagonista de receptores TRk (Jang S.W, 2010). Andero e colaboradores mostraram ainda que o 7,8DHF por meio da fosforilação do receptor TRkB, foi capaz de promover proliferação celular no giro dentiado do hipocampo e ainda apresentar efeito tipo antidepressivo em animais submetidos ao nado forçado. Todos esses resultados reforçam a hipótese de que a sinalização mediada por TRkB tem um papel importante na neurobiologia da depressão (Andero *et al.*, 2011).

Como já descrito anteriormente, um amplo corpo de evidencias implicam na desregularão da proteína mTOR como fator importante na etiologia de várias desordens psiquiátricas e neurológicas. Evidências recentes indicam que a mTOR pode ser um importante mediador capazes de inverter déficits neurológicos e comportamentais decorrentes da exposição ao estresse (Hoeffer e Klann, 2010). O complexo mTOR tem atribuições na integração da atividade neuronal e expressão de sinais, fatores de crescimento, de energia, e nos níveis de nutrientes para regular as taxas de tradução de proteínas e da plasticidade sináptica, bem como outras funções celulares (Zoncu, Efeyan e Sabatini, 2011). Estudos recentes mostram que a atividade da proteína mTOR está reduzida no CPF de indivíduos deprimidos (Jernigan *et al.*, 2011). Farmacologicamente, antidepressivos incluem inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina, seletivos da recaptação da serotonina, os inibidores da monoamina oxidase e antidepressivos atípicos. Essas classes de antidepressivos requerem tratamento crônico para obtenção do efeito terapêutico, que pode demorar semanas

para se manifestar na forma de melhora clínica. Esse quadro sugere que as alterações de vias de sinalização intracelular e expressão gênica a longo prazo podem ser a base dos mecanismos de ação antidepressiva. Cronicamente, a administração de inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina aumentam a sinalização para AMPc-CREB, que subsequentemente aumenta a expressão de BDNF ((Nibuya, Nestler e Duman, 1996; Duman e Monteggia, 2006). Adicionalmente, a via de sinalização MAPK é requerida para melhora comportamental tradicional desses antidepressivos (Duman *et al.*, 2007). Diversas podem ser as vias envolvidas no efeito terapêutico dos antidepressivos, o que justificaria essa janela temporal para aparecimento do efeito dessas drogas. Por outro lado, estudos pré-clínicos recentes demonstraram que a ketamina induz efeito antidepressivo agudo associado à sua capacidade de produzir uma rápida indução de síntese de proteínas, aumento da densidade e da maturação de espinhas dendríticas, bem como da sinaptogênese no CPFMv. Esses efeitos são mediados pela ativação da proteína mTOR (Li *et al.*, 2010).

Essas evidências sugerem que o efeito tipo antidepressivo agudo e rápido dos inibidores da metilação do DNA, poderia envolver a mesma via de sinalização. Os resultados comportamentais obtidos no presente estudo corroboram essa hipótese ao demonstrar que o efeito tipo-antidepressivo dos inibidores de DNMTs pode ser bloqueado pela administração intra-CPFMv de k252a e rapamicina, antagonista de Trk e inibidor da atividade enzimática da mTOR, respectivamente.

Por outro lado, observamos que a administração sistêmica RG108 não foi capaz de reduzir a metilação global no CPFmv, sugerindo que o efeito antidepressivo do RG108, não esta associado a diminuição global do metilação nessa estrutura. Contudo, resultados do nosso grupo de pesquisa mostram que o 5-azaD, também inibidor das DNMts, é capaz de reduzir a metilação no hipocampo e que esse resultado pode se apresentar em sentido contrário no CPF (Sales, 2014). Outro fator bastante relevante para esse resultado foi o método de analise da

metilação usado, a analise global da metilação do DNA. Essa medida não apresenta especificidade de genes a serem medidos, o resultado expressa uma condição geral da estrutura. Nesse caso pode ser que esteja havendo a inibição da metilação de genes para fenótipo antidepressivo, entretanto o balanço geral do quadro de metilação do DNA não reflita essa alteração.

Como já discutido anteriormente, a injeção intra-CPFmv de k252a e rapamicina impediram o efeito antidepressivo induzido pela administração sistêmica do RG108. Porém não foi possível perceber uma alteração na expressão total TrKB ou mTOR no córtex. Esses resultados sugerem que a síntese dessas proteínas requer maior tempo de sinalização, e que o período de uma hora após a administração ip de RG108, não é capaz de induzir modificações na maquinaria de tradução intracelular, proporcionando a síntese de novas proteínas. Entretanto, foi observado no nosso grupo de pesquisa que a administração sistêmica aguda de anisomicina (inibidor de síntese proteica) em camundongos impede o aparecimento do efeito antidepressivo do RG108 (dados não publicados).

Diante desses dados é esperado que houvesse uma alteração na atividade de TRkB, refletida pela fosforilação do receptor, porém, os resultado desse estudo mostrou que não há alteração na fosforilação de TRkB (resíduo Try706/707) no CPFmv de animais que receberam administração sistêmica de R108. Aqui faz-se necessário uma investigação mais detalhada da fosforilação resíduo-específica desse receptor. Frazer e colaboradores mostrou que a terapia de estimulação do nervo vago (VNS), usada em a pacientes com depressão resistente, promove efeito antidepressivo rápido e que esse efeito está associado a fosforilação do resíduo Try515, sem nenhuma alteração de fosforilação do resíduo Try706/707 (Carreno e Frazer, 2014). A similaridade do efeito terapêutico existente entre os inibidores da metilação do DNA e a VNS (efeito antidepressivo agudo e rápido) nos permite sugerir que haja um

aumento da fosforilação do resíduo Try515 do receptor TRkB no mecanismo antidepressivo induzido pelo RG108.

Outro resultado bastante surpreendente, foi a ausência de efeito sobre a fosforilação da enzima mTOR, a pesar da inibição da mesma pela Rapamicina impedir o efeito antidepressivo promovido pelo RG108. Nesse caso é possível que o RG108 esteja regulando a atividade de algumas proteínas anteriores a mTOR na cascata de sinalização, nesse sentido existe evidencia na literatura de que as proteínas PI3K e Akt, são regulados por mecanismos epigenético, mas especificamente por metilação (Yu, M et al; 2013). Dados de Frazer, em 2013, corroboram essa hipótese uma vez que a VNS aumentou a fosforilação da PI3K e P70S6 (nesse estudo não foi medida a fosforilação diretamente no resíduo ativo da mTOR), sendo a proteína P70S6 uma proteína importante envolvida no efeito antidepressivo da ketamina (efeito antidepressivo agudo e rápido). É importante lembrar que a analise da fosforilação de proteínas por western blot tem suas limitações de detecção, e nesse caso a sensibilidade da técnica pode estar sendo insuficiente.

Tendo o BDNF papel principal na nossa hipótese de efeito antidepressivo induzido por inibidores da metilação do DNA, nos preocupamos em medir os níveis dessa neurotrofina presente no CPF. Novamente, o tratamento com RG108 não foi capaz de alterar os níveis de BDNF no CPF. Entretanto, tem que ser considerado uma variável metodológica importante na interpretação desses dados. O ensaio de ELISA para BDNF é realizado a partir de amostras maceradas de CPF, o que nos impede distinguir se o BDNF presente nas amostras é proveniente de estoque em vesículas ou se trata de BDNF liberado para ativar TRkB. Essa observação é importante uma vez que dados da literatura mostram que a ativação da via BDNF-TRkB, no córtex e hipocampo, está aumentada pelo tratamento com antidepressivos sem que tenha sido detectado aumento na expressão de BDNF (Saarelainen *et al.*, 2003; Rantamaki *et al.*, 2007).

Diante das evidências apresentadas e dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos sugerir que o efeito tipo antidepressivo apresentado pela administração sistêmica aguda dos inibidores da metilação do DNA, RG108 e 5azaD, no teste do nado forçado tenham participação importante do CPFmv, e parece ser necessária a funcionalidade da via BDNF-TRkB-mTOR. Entretanto, ainda faz-se necessário a realização de estudos complementares que mostrem quais proteínas são diretamente reguladas na obtenção do efeito antidepressivo induzido pelos inibidores da metilação do DNA.

7 REFERÊNCIAS

ABEL, E. L.; BILITZKE, P. J. A POSSIBLE ALARM SUBSTANCE IN THE FORCED SWIMMING TEST. **Physiology & Behavior,** v. 48, n. 2, p. 233-239, Aug 1990. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1990DV53800004 >.

ADACHI, M. et al. Selective loss of brain-derived neurotrophic factor in the dentate gyrus attenuates antidepressant efficacy. **Biological Psychiatry,** v. 63, n. 7, p. 642-649, Apr 1 2008. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254107100002 >.

AMAT, J. et al. Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus. **Nature Neuroscience,** v. 8, n. 3, p. 365-371, Mar 2005. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227354600022 >.

ANDERO, R. et al. Effect of 7,8-Dihydroxyflavone, a Small-Molecule TrkB Agonist, on Emotional Learning. **American Journal of Psychiatry,** v. 168, n. 2, p. 163-172, Feb 2011. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286972800010 >.

AUTRY, A. E. et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. **Nature,** v. 475, n. 7354, p. 91-U109, Jul 7 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292461300051 >.

BARBACID, M. NEUROTROPHIC FACTORS AND THEIR RECEPTORS. **Current Opinion in Cell Biology,** v. 7, n. 2, p. 148-155, Apr 1995. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QP34900002 >.

BORRELLI, E. et al. Decoding the Epigenetic Language of Neuronal Plasticity. **Neuron,** v. 60, n. 6, p. 961-974, Dec 26 2008. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262208900005 >.

BRADFORD, M. M. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. **Analytical Biochemistry,** v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1976BU74400029 >.

BROMET, E. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **Bmc Medicine,** v. 9, Jul 26 2011. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294430000001 >.

BROWN, S. M.; HENNING, S.; WELLMAN, C. L. Mild, short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex,** v. 15, n. 11, p. 1714-1722, Nov 2005. ISSN 1047-3211. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232595700007 >.

BRUECKNER, B. et al. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. **Cancer Research,** v. 65, n. 14, p. 6305-6311, Jul 15 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230633400040 >.

CARRENO, F. R.; FRAZER, A. Activation of signaling pathways downstream of the brain-derived neurotrophic factor receptor, TrkB, in the rat brain by vagal nerve stimulation and antidepressant drugs. **International Journal of Neuropsychopharmacology,** v. 17, n. 2, p. 247-258, Feb 2014. ISSN 1461-1457; 1469-5111. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000330594200007 >.

COVIC, M.; KARACA, E.; LIE, D. C. Epigenetic regulation of neurogenesis in the adult hippocampus. **Heredity,** v. 105, n. 1, p. 122-134, Jul 2010. ISSN 0018-067X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279097000014 >.

COVINGTON, H. E., III et al. Antidepressant Actions of Histone Deacetylase Inhibitors. **Journal of Neuroscience,** v. 29, n. 37, p. 11451-11460, Sep 16 2009. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269834100007 >.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** v. 29, n. 4-5, p. 547-569, 2005 2005. ISSN 0149-7634. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230068700005 >.

CZEH, B.; FUCHS, E. Effects of chronic social stress and fluoxetine treatment on the vascular niche and neurogenesis in the hippocampus. **European Neuropsychopharmacology,** v. 18, p. S346-S346, Aug 2008. ISSN 0924-977X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259593801042 >.

DREVETS, W. C. Neuroimaging abnormalities in depression: Implications for dopaminergic function. **International Journal of Psychology,** v. 35, n. 3-4, p. 98-98, Jun-Aug 2000. ISSN 0020-7594. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088388800953 >.

DUMAN, C. H. et al. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. **Biological Psychiatry,** v. 61, n. 5, p. 661-670, Mar 1 2007. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244476800011 >.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Psychiatry,** v. 59, n. 12, p. 1116-1127, Jun 15 2006. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238692300003 >.

ESSMAN, W. B. CHANGES IN LOCOMOTOR ACTIVITY AND BRAIN CHEMISTRY FOLLOWING LSD-25 ADMINISTRATION IN MICE. **Psychological Reports,** v. 20, n. 1, p. 124-&, 1967 1967. ISSN 0033-2941. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19679085900031 >.

GREENBERG, P. E. et al. The economic burden of depression in the United States: How did it change between 1990 and 2000? **Journal of Clinical Psychiatry,** v. 64, n. 12, p. 1465-1475, Dec 2003. ISSN 0160-6689. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187617300011 >.

HINDMARCH, I. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. **European Psychiatry,** v. 17, p. 294S-299S, Jul 2002. ISSN 0924-9338. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000177783200002 >.

HOEFFER, C. A.; KLANN, E. mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. **Trends in Neurosciences,** v. 33, n. 2, p. 67-75, Feb 2010. ISSN 0166-2236. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275085600002 >.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. **Annual Review of Biochemistry,** v. 72, p. 609-642, 2003 2003. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185092500019 >.

IZQUIERDO, A.; WELLMAN, C. L.; HOLMES, A. Brief uncontrollable stress causes dendritic retraction in infralimbic cortex and resistance to fear extinction in mice. **Journal of Neuroscience,** v. 26, n. 21, p. 5733-5738, May 24 2006. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237809900016 >.

JERNIGAN, C. S. et al. The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry,** v. 35, n. 7, p. 1774-1779, Aug 15 2011. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294941800037 >.

JONES, P. A.; TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science,** v. 293, n. 5532, p. 1068-1070, Aug 10 2001. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170432600041 >.

KIM, J. K.; SAMARANAYAKE, M.; PRADHAN, S. Epigenetic mechanisms in mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences,** v. 66, n. 4, p. 596-612, Feb 2009. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263418300005 >.

KOPONEN, E. et al. Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines. **Cellular and Molecular Neurobiology,** v. 25, n. 6, p. 973-980, Sep 2005. ISSN 0272-4340. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234409500002 >.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature,** v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct 2008. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260038300037 >.

_____. Linking Molecules to Mood: New Insight Into the Biology of Depression. **American Journal of Psychiatry,** v. 167, n. 11, p. 1305-1320, Nov 2010. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283669500007 >.

LAPLANT, Q. et al. Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. **Nature Neuroscience,** v. 13, n. 9, p. 1137-U141, Sep 2010. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281332600020 >.

LESSMANN, V.; BRIGADSKI, T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. **Neuroscience Research,** v. 65, n. 1, p. 11-22, Sep 2009. ISSN 0168-0102. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269102700003 >.

LI, N. X. et al. mTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists. **Science,** v. 329, n. 5994, p. 959-964, Aug 2010. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281084800039 >.

_____. 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, Apr 2011. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288852800013 >.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. The cellular neurobiology of depression. **Nature Medicine,** v. 7, n. 5, p. 541-547, May 2001. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169961100031 >.

MILLER, C. A.; SWEATT, J. D. Covalent modification of DNA regulates memory formation. **Neuron,** v. 53, n. 6, p. 857-869, Mar 15 2007. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245292800010 >.

MOLTENI, R. et al. Antipsychotic drug actions on gene modulation and signaling mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics,** v. 124, n. 1, p. 74-85, Oct 2009. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269873700006 >.

MUSAZZI, L. et al. Acute Stress Increases Depolarization-Evoked Glutamate Release in the Rat Prefrontal/Frontal Cortex: The Dampening Action of Antidepressants. **Plos One,** v. 5, n. 1, Jan 5 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273338500010 >.

NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **Journal of Neuroscience,** v. 16, n. 7, p. 2365-2372, Apr 1 1996. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UA74200021 >.

PEREIRA V. S., Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo- 2011.73f.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. BEHAVIORAL DESPAIR IN RATS AND MICE - STRAIN DIFFERENCES AND EFFECTS OF IMIPRAMINE. **European Journal of Pharmacology,** v. 51, n. 3, p. 291-294, 1978 1978. ISSN 0014-2999. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1978FU53400011 >.

PORSOLT, R. D.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. DEPRESSION - NEW ANIMAL-MODEL SENSITIVE TO ANTIDEPRESSANT TREATMENTS. **Nature,** v. 266, n. 5604, p. 730-732, 1977 1977. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1977DC52400047 >.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neurocircuitry of Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology,** v. 35, n. 1, p. 192-216, Jan 2010. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272784600011 >.

RANTAMAKI, T. et al. Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-C gamma signaling pathways in mouse brain. **Neuropsychopharmacology,** v. 32, n. 10, p. 2152-2162, Oct 2007. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249506000011 >.

RYGULA, R. et al. Effects of fluoxetine on behavioral deficits evoked by chronic social stress in rats. **Behavioural Brain Research,** v. 174, n. 1, p. 188-192, Nov 1 2006. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241441500022 >.

SAARELAINEN, T. et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **Journal of Neuroscience,** v. 23, n. 1, p. 349-357, Jan 1 2003. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180202300043 >.

SAENZ, J. C. B.; VILLAGRA, O. R.; TRIAS, J. F. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behavioural Brain Research,** v. 169, n. 1, p. 57-65, Apr 25 2006. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236136800007 >.

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. 1711-1721, Nov 2011. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000296908300014 >.

SALES, A.J. **Participação da metilação do DNA no efeito de drogas antidepressivas.** 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

SAPAN, C. V.; LUNDBLAD, R. L.; PRICE, N. C. Colorimetric protein assay techniques. **Biotechnology and Applied Biochemistry,** v. 29, p. 99-108, Apr 1999. ISSN 0885-4513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000079702100002 >.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models. **Neuropsychopharmacology,** v. 35, n. 12, p. 2378-2391, Nov 2010. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282960200008 >.

SCHROEDER, F. A. et al. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. **Biological Psychiatry,** v. 62, n. 1, p. 55-64, Jul 1 2007. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247653500009 >.

SCOPINHO, A. A. et al. Acute reversible inactivation of the ventral medial prefrontal cortex induces antidepressant-like effects in rats. **Behavioural Brain Research,** v. 214, n. 2, p. 437-442, Dec 10 2010. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000281318700036 >.

STRESEMANN, C. et al. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. **Cancer Research,** v. 66, n. 5, p. 2794-2800, Mar 1 2006. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235826400040 >.

TSANKOVA, N. et al. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature Reviews Neuroscience,** v. 8, n. 5, p. 355-367, May 2007. ISSN 1471-0048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246395200014 >.

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. 519-525, Apr 2006. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236310700019 >.

WEBER, M.; SCHUEBELER, D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. **Current Opinion in Cell Biology,** v. 19, n. 3, p. 273-280, Jun 2007. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247775200005 >.

WURTMAN, R. J. Genes, stress, and depression. **Metabolism-Clinical and Experimental,** v. 54, n. 5, p. 16-19, May 2005. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000229228300005 >.

YAMAMOTO, S. et al. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. **Neuropsychopharmacology,** v. 33, n. 9, p. 2108-2116, Aug 2008. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257622200006 >.

YU, M. et al. Folic acid stimulation of neural stem cell proliferation is associated with altered methylation profile of PI3K/Akt/CREB. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 496-502, Dec 2013.

ZHANG, T.-Y. et al. Maternal Care and DNA Methylation of a Glutamic Acid Decarboxylase 1 Promoter in Rat Hippocampus. **Journal of Neuroscience,** v. 30, n. 39, p. 13130-13137, Sep 29 2010. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282571800024 >.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** v. 12, n. 1, p. 21-35, Jan 2011. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000285544000011 >.