

HELENA MENDES ABELAIRA

**O PAPEL DA VIA mTOR NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA
CETAMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Gislaíne Zilli Réus

CRICIÚMA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A139p Abelaira, Helena Mendes.

O papel da via mTOR no efeito antidepressivo da cetamina / Helena Mendes Abelaira ; orientador : João Luciano de Quevedo ; coorientadora: Gislaïne Zilli Réus. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2017.

113 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

1. Transtorno depressivo maior - Tratamento.
2. Cetamina – Uso terapêutico.
3. Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
4. Estresse oxidativo.
5. Antidepressivos. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Helena Mendes Abelaira** sob o título “**O PAPEL DA VIA mTOR NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA CETAMINA**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 10 de fevereiro de 2017.

Prof.ª **Dra. ALEXANDRA IOPPI ZUGNO**
Membro Relator – UNESC

Prof.ª **Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**
Membro Interno – UNESC

Prof.ª **Dra. JUCÉLIA JEREMIAS FORTUNATO**
Membro Externo - UNISUL

Prof. **Dr. IVES CAVALCANTE PASSOS**
Membro Externo – UFRGS

Prof.ª **Dra. Josiane Budni**
Rep. do Orientador Prof. João Luciano de Quevedo

Prof.ª **Dra. Josiane Budni**
Coordenadora Adjunta do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.

Os ensaios bioquímicos de determinação de níveis de proteínas pela técnica Western Blotting foram realizados pelo Laboratório de Fisiopatologia do PPGCS da UNESC.

Os ensaios bioquímicos sobre o estresse oxidativo e nitrosativo e níveis de citocinas pró-inflamatórias foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia Clínica e Experimental do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL, Tubarão, SC.

*“Dedico este trabalho ao meu pai,
Antonio, que sempre me apoiou e
teve um orgulho imenso das
minhas escolhas.”*

AGRADECIMENTOS

Ao professor João Quevedo, pela oportunidade e confiança depositada, e ao ensinamento compartilhado durante o tempo do doutorado.

A Gislaine Z. Réus que pela atenção e carinho tornou-se especial para mim. Ao Chrystian M. Freitas, pela paciência nos dias difíceis, incentivo constante e por fazer parte da minha vida.

Aos alunos de iniciação científica da Unidade de Depressão, Airam B. de Moura, Danyela Matos, Ana Caroline Darabas, Thays G. de Souza, Thais Ruschel, Caroline S. de Freitas, Ana Paula Strassi e Murilo Parzianello, pela ajuda constante nos trabalhos, além da amizade.

As amigas, Zuleide M. Ignácio e Amanda L. Maciel, por toda a contribuição e amizade.

Aos meus pais, que muito me apoiaram nos momentos difíceis e por toda a dedicação.

A toda a família, que sempre acreditou que eu fosse capaz.

A Deus, que sempre me abriu muitas portas e me proporcionou tudo isso.

E finalmente, a todos que tornaram este estudo possível, os meus mais sinceros agradecimentos.

*“Os que se encantam com a
prática sem a ciência são como os
timoneiros que entram no navio
sem timão nem bússola, nunca
tendo certeza do seu destino.”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Estudos recentes indicam que a via de sinalização da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) está relacionada com a fisiopatologia do transtorno depressivo maior (TDM). A cetamina, um antagonista do receptor N-metil-D-asparto (NMDA), foi identificada como uma nova terapia para o TDM, no entanto, o seu mecanismo de ação como antidepressivo não é ainda totalmente compreendido. Evidências indicam que a ativação da via mTOR no córtex frontal (CF) é requerida para os efeitos antidepressivos da cetamina. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos em diferentes regiões cerebrais após a administração de cetamina e a inibição da via de sinalização mTOR no CF de ratos. Para este fim, ratos Wistar machos adultos foram divididos em 4 grupos experimentais: 1) veículo + sal; 2) veículo + rapamicina; 3) veículo + cetamina 15 mg/kg; 4) rapamicina + cetamina 15 mg/kg. O inibidor farmacológico da via mTOR, a rapamicina na dose de 0,2 nmol ou veículo (grupo controle), foram administrados diretamente no CF 1 hora antes do teste do nado forçado (TNF) e 30 minutos antes da administração intraperitoneal de cetamina ou salina. Após o TNF as estruturas cerebrais: CF, amígdala, hipocampo e núcleo acumbens (NAc) e soro foram retirados para as análises bioquímicas (parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo, níveis de citocinas e níveis de proteínas relacionadas com a via mTOR e estresse de retículo (ER)). Os resultados mostraram que a rapamicina foi capaz de bloquear os efeitos antidepressivos da cetamina no tempo de imobilidade no TNF. A cetamina aumentou os níveis das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), carbonilação de proteínas, níveis de nitrito/nitrato e atividade da mieloperoxidase (MPO) e diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em algumas áreas cerebrais analisadas. No entanto, a inibição da via de sinalização mTOR pela rapamicina no CF, foi capaz de proteger contra o estresse oxidativo através da diminuição do dano a proteínas e lipídeos e o aumento das enzimas antioxidantes. Os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) aumentaram no soro após a administração de cetamina. Os níveis da proteína mTOR foram reduzidos no grupo rapamicina tratado com salina e cetamina no CF. Houve uma redução nos níveis de p4EBP1 no grupo rapamicina tratado com cetamina no CF e NAc e ainda, os níveis da pEF2K foram aumentados no CF no grupo veículo tratado com cetamina e diminuídos no grupo rapamicina tratado com cetamina. Os níveis de PERK e IRE1-

alfa foram diminuídos no CF no grupo rapamicina tratado com cetamina. Os achados do presente estudo sugerem que a inibição da via de sinalização mTOR pode estar envolvida, pelo menos em parte, com o mecanismo de ação da cetamina; e que o efeito antidepressivo da cetamina sobre os níveis das proteínas do ER podem ser mediados pela via de sinalização mTOR em áreas cerebrais envolvidas com a regulação do humor. Sugere-se também que a inibição da via mTOR pode proteger o cérebro contra o estresse oxidativo e nitrosativo induzidos pela cetamina.

Palavras-chave: mTOR; estresse oxidativo; estresse de retículo; sistema glutamatérgico; cetamina; transtorno depressivo maior.

ABSTRACT

Recent studies have indicated that signaling of the mammalian target of rapamycin (mTOR) is related to the pathophysiology of major depressive disorder (MDD). Activation of the mTOR pathway is also shown to be necessary for the rapid antidepressant actions of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor antagonist. Ketamine, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, has been identified as a novel MDD therapy; however, the antidepressant's mechanism of action is not fully understood. In addition, the effects of ketamine after mTOR inhibition have not yet been fully investigated. Thus, the present study was aimed at evaluating the behavioral and molecular effects of ketamine administration, when used as an antidepressant, after the inhibition of the mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex of Wistar rats. For this purpose, 60-day old male Wistar rats were divided into 4 experimental groups (n = 10): 1) vehicle + saline; 2) vehicle + ketamine 15 mg/kg; 3) rapamycin + saline; 4) rapamycin + ketamine 15 mg/kg. The pharmacological inhibitor of the mTOR pathway, rapamycin (at the dose of 0,2 nmol) or the vehicle (control group), were administered directly into the prefrontal cortex 1 hour before the behavioral and forced swimming tests, and 30 minutes prior to the intraperitoneal administration of ketamine or saline. After the forced swim test, the animals were killed by decapitation and the prefrontal cortex, amygdala, hippocampus and nucleus acumbens were removed for biochemical analysis. The parameters of oxidative and nitrosative stress, and the levels of cytokines and proteins related to the mTOR pathway and reticulum stress (RE) were then evaluated. mTOR activation in the PFC was essential to the antidepressant-like effect of ketamine. Ketamine increased the levels of lipid damage in the PFC, hippocampus, and amygdala. The level of protein carbonyl was found to be elevated within the PFC, amygdala and NAc after ketamine administration. Ketamine also increased the levels of nitrite/nitrate in the PFC, hippocampus, amygdala, and NAc. Myeloperoxidase activity increased in the hippocampus and NAc after ketamine administration. The activities of superoxide dismutase and catalase were reduced after the administration of ketamine in all of the brain areas studied. Inhibition of the mTOR signaling pathways by rapamycin within the PFC was required to protect against oxidative stress by reducing the levels of damage, and increasing the levels of antioxidant enzymes. Finally, ketamine was found to have caused an increase in the levels of TNF- α in serum, however, in the rapamycin plus treatment group, it was

not able to block this increase. The levels of mTOR were found to have reduced in the rapamycin group which was treated with saline and ketamine in the PFC; p4EBP1 levels were reduced in the rapamycin group which was treated with ketamine in the PFC and nucleus accumbens; the levels of p-eEF2K were increased within the PFC in the vehicle group which was treated with ketamine, and were reduced in the rapamycin group treated with ketamine. The PERK and IRE1-alpha levels were decreased within the PFC in the rapamycin group which was treated with ketamine. The results of the present study suggest that inhibition of the mTOR signaling pathway may be involved, at least in part, with the mechanism of action of ketamine; and that the antidepressant effect of ketamine on ER protein levels may be mediated by the mTOR signaling pathway in some brain areas. It is also suggested that inhibition of the mTOR pathway is able to protect some brain areas against oxidative and nitrosative stress.

Keywords: mTOR; oxidative stress; reticulum stress; glutamatergic system; ketamine; major depressive disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da sinapse glutamatérgica.....	33
Figura 2 - Via de sinalização mTORC1 e mTORC2.....	36
Figura 3 - Vias inflamatórias e de estresse oxidativo e nitrosativo que causam a progressão degenerativa..	38
Figura 4 - Vias de tradução do sinal ativado pelo ER..	42
Figura 5 - Interação entre a via de resposta a proteínas não-enoveladas e mTORC1.....	46
Figura 6 - Os processos biológicos da via de resposta a proteínas não-enoveladas e o mTORC1.....	47
Figura 7 - Esquema do desenho experimental.....	52
Figura 8 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os tempos de imobilidade, nado forçado.....	57
Figura 9 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis de TBARS no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	59
Figura 10 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre formação de proteínas carbonil no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	60
Figura 11 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre concentração de nitrito/nitrato no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	61
Figura 12 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre atividade da mieloperoxidase no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	62
Figura 13 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre atividade da SOD no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	63
Figura 14 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre a atividade da CAT no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	64
Figura 15 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro.....	65
Figura 16 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína mTOR no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	66

Figura 17 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína p4EBP1 no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	68
Figura 18 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína peEF2K no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	70
Figura 20 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína IRE1-alfa no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	74
Figura 21 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína PERK no CF, hipocampo, amígdala e NAc.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 DEPRESSÃO	29
1.2 REGIÕES CEREBRAIS ENVOLVIDAS NO TDM.....	30
1.4 VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR E TDM.....	34
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E TDM.....	37
1.6 ESTRESSE DO RETÍCULO E TDM	40
1.7 LIGAÇÕES ENTRE A CASCATA DE SINALIZAÇÃO MTOR E O ESTRESSE DO RE	44
1.8 CETAMINA E TDM	47
2 OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVO GERAL	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3 METODOLOGIA	51
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	51
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	51
3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	51
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	51
3.5 TESTE COMPORTAMENTAL	52
3.5.1 Teste do nado forçado	52
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	53
3.6.1 Preparação do tecido e homogenado	53
3.6.2 Procedimentos de análise de estresse oxidativo	53
3.6.2.1 Atividade da mieloperoxidase	53
3.6.2.2 Formação de TBARS	54
3.6.2.3 Formação de proteínas carbonil	54
3.6.2.4 Atividade da enzima SOD.....	55
3.6.2.5 Atividade da enzima CAT.....	55
3.6.3 Procedimentos de análise de estresse nitrosativo	55
3.6.3.1 Medida da concentração de nitrito/nitrato	55
3.6.4 Quantificação de proteínas por Western blotting	56
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
4 RESULTADOS	57
4.1 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO TESTE DO NADO FORÇADO (TNF).....	57

4.2 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NOS NÍVEIS DE TBARS, NA FORMAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONIL, NA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO/NITRATO E NA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM DIFERENTES ESTRUTURAS CEREBRAIS.....	58
4.3 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NA ATIVIDADE DA SOD E CAT EM ESTRUTURAS CEREBRAIS	62
4.4 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NOS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO SORO.....	64
4.5 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NOS NÍVEIS DA PROTÉINAS MTOR, 4EBP1 E EFF2K EM ESTRUTURAS CEREBRAIS.....	65
4.6 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NOS NÍVEIS DA PROTÉINAS CHOP, IRE1-ALFA E PERK EM ESTRUTURAS CEREBRAIS	71
5 DISCUSSÃO	77
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO	111
ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) tem enormes consequências para a qualidade de vida das pessoas, e é uma das formas mais prevalentes de doença mental (Larsen et al., 2010). É um transtorno clínico e biologicamente heterogêneo, com 10%-30% das mulheres e 7%-15% dos homens susceptíveis de sofrerem depressão em sua vida útil (Briley e Moret, 2000). Além disso, pacientes que sofrem depressão severa apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, com consequências econômicas e sociais profundas (Nemeroff e Owens, 2002).

As combinações de múltiplos fatores genéticos podem estar envolvidas no desenvolvimento do TDM, entretanto um defeito em um único gene normalmente não induz a expressão dos sintomas da depressão (Burmeister, 1999). Além disso, vários fatores não genéticos, como estresse, trauma afetivo, infecção viral, do desenvolvimento neurológico e outras anormalidades aumentam a complexidade da patogênese do transtorno (Nemeroff e Owens, 2002).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, IV edição da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV) caracteriza o TDM como tendo dois sintomas principais – humor deprimido e/ou anedonia, definida como a perda do prazer das coisas que normalmente são agradáveis. Para o diagnóstico é necessário também a presença de pelo menos outros cinco sintomas associados, como por exemplo, perda de apetite, distúrbios do sono, agitação ou retardo psicomotor, diminuição da energia, sentimentos de inutilidade e culpa e/ou ideação suicida). Estes sintomas devem persistir por pelo menos duas semanas e causar prejuízo significativo do funcionamento social, profissional e pessoal (Duman et al., 1998).

Como uma compreensão básica do tratamento do TDM, a hipótese monoaminérgica foi formulada em meados dos anos 1960 com base na eficácia dos antidepressivos na recaptação de monoaminas (Belmaker, 2008). Esta hipótese sugere uma deficiência ou desequilíbrio nos neurotransmissores monoaminérgicos, tais como dopamina, serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE), como a causa do TDM. Entre os agentes terapêuticos, os antidepressivos tricíclicos, incluindo, inibidores da monoamina oxidase e inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs) exercem sua ação terapêutica através de sua capacidade em aumentar o conteúdo sináptico dos neurotransmissores

monoaminérgicos (Morilak, 2004). Embora as ações do tratamento agudo destes fármacos estejam envolvidas com a modulação do sistema monoaminérgico, sua ação em longo prazo ainda não são totalmente compreendidas.

O tratamento atual para depressão é geralmente seguro e efetivo, porém está longe do ideal, pois se estima que mais de um terço dos pacientes que sofrem de depressão são resistentes ao tratamento e para a maioria destes o tratamento com antidepressivos monoaminérgicos está inadequado (Trivedi et al., 2006). Assim, se faz necessário a utilização de terapias inovadoras com novos e rápidos mecanismos de ação (Lapidus et al., 2013).

1.2 REGIÕES CEREBRAIS ENVOLVIDAS NO TDM

Uma variedade de alterações neuroanatômicas foi encontrada em várias populações de indivíduos que sofrem dos mais diferentes tipos de transtornos psiquiátricos, entre eles o TDM (Joseph, 1996). No TDM, as regiões cerebrais mais estudadas são as áreas frontais e suas conexões, bem como as áreas temporais (Rozenthal et al., 2004). O córtex frontal (CF) mantém íntimas conexões com as vias límbicas, amplamente relacionadas com a regulação dos aspectos emocionais (Rozenthal et al., 2004). Estudos *pós-mortem* mostraram que indivíduos deprimidos apresentaram uma diminuição na espessura cortical, tamanho neuronal e perda de células da glia nas camadas II-IV do córtex orbito frontal rostral (Ongur et al., 1998; Rajkowska et al., 1999). Além disso, reduções gliais e neuronais, em todas as camadas, bem como redução do tamanho das células, foram relatadas no CF dorsolateral (Ongur et al., 1998). Perda de células da glia no CF subgenual também foi associada com o TDM (Ongur et al., 1998).

O CF também é particularmente importante como um alvo de projeções do sistema monoaminérgico, bem como, anormalidades em seus receptores, transportadores e sistemas de segundo mensageiros que são também descritas no TDM (Arango et al., 1995; Biver et al., 1997; Duman, 1998; Mintun et al., 2000). Além disso, o CF orbito medial possui altas concentrações de receptores de glucocorticóides, o que o torna potencialmente vulnerável a danos mediados pelo estresse (Sheline et al., 2003).

Vários estudos também tem avaliado o volume do hipocampo no TDM. Estudos de ressonância cerebral em pacientes deprimidos indicam uma significativa redução do volume do hipocampo em comparação com indivíduos saudáveis (Sheline et al., 1996, 1999; Shah et al., 1998;

Bremner et al., 2000; Bell-McGinty et al., 2002; MacQueen et al., 2003). A perda de volume parece estar relacionada com a associação entre a depressão aguda e disfunções na memória declarativa (Burt et al., 1995) e memória de recordação (Mac-Queen et al., 2003). Bowley e colaboradores (2002) também mostraram, em um estudo *pós-mortem*, uma perda de células da glia no giro denteado do hipocampo, bem como na amígdala, em pacientes deprimidos. Outro estudo relatou um aumento da densidade de empacotamento de células neuronais e gliais, o que sugere uma diminuição do neurópilo, área formada por dendritos compactados, do hipocampo no TDM (Stockmeier et al., 2004).

A amígdala também vem sendo amplamente estudada nos transtornos afetivos por estar intimamente relacionada ao aprendizado emocional (Kennedy et al., 1997). Ao contrário do CF e do hipocampo, os quais têm a atividade e volume reduzidos no TDM, a amígdala possui a atividade e a morfologia aumentadas (Drevets, 2003). De fato, estudos de imagem mostraram um aumento no volume da amígdala em pacientes com TDM (Bremner et al., 2000; Lange e Irlle, 2004). Além disso, em modelos animais, foi mostrado que a atividade nesta região aumenta quando o animal se depara com estímulos carregados de emoção e a estimulação da amígdala central resulta em respostas emocionais, como o medo, na ausência de estímulos externos (Rozenthal et al., 2004). Neste contexto, estas alterações encontradas na amígdala eventualmente podem contribuir para a ativação de circuitos neurais que controlam o medo, a ansiedade e a emoção (Pittenger e Duman, 2008).

Outra estrutura cerebral na qual a neuroplasticidade pode estar relacionada aos efeitos do estresse e aos sintomas da depressão é o estriado ventral, incluindo o núcleo acumbens (NAc). O NAc desempenha um papel central nos mecanismos de defesa natural, e já foi demonstrado que alterações nessa estrutura estão relacionados ao TDM, principalmente com os sintomas de anedonia (Dunn et al., 2002; Nestler e Carlezon, 2006). Por tanto, tanto o estresse agudo quanto o crônico podem exercer diversos efeitos nas diferentes funções e regiões cerebrais, um fato importante para melhor compreender a fisiopatologia da depressão.

1.3 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E TDM

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e desempenha um papel central na plasticidade

sináptica, no aprendizado e na memória (Orrego et al., 1993), dentre outros processos. Alguns estudos revelam os mecanismos intracelulares pelos quais o glutamato causa alterações na eficiência sináptica, transcrição gênica e morfologia neural (Mayer e Westbrook, 1987; Kind e Neumann, 2001). Por outro lado, o glutamato também está envolvido em processos fisiopatológicos, incluindo, dor, trauma, epilepsia, esquizofrenia, entre outros (Orrego et al., 1993).

Este aminoácido é sintetizado nos terminais pré-sinápticos, predominantemente a partir da glutamina através da ação da enzima glutaminase, mas pode provir do α -cetoglutarato, via glutamato desidrogenase e α -cetoglutarato aminotransferases (Kvamme et al., 1998). Um aumento nas quantidades de glutamato na fenda sináptica pode levar a estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos com consequente morte neuronal (Lipton e Rosenberg, 1994). Entretanto a ação excitatória do glutamato é finalizada através da sua captação pelas células gliais ou pelos neurônios pré-sinápticos, onde é armazenado em vesículas sinápticas (Kvamme et al., 1998).

Para exercer suas funções, o glutamato é empacotado em vesículas sinápticas de cálcio-dependente através dos transportadores de glutamato vesicular (VGLUTs) (Figura 1) (Meloni et al., 1993) e logo após, as proteínas do complexo SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF]- attachment protein receptor) realizam sua exocitose para a fenda sináptica (Lesch et al., 2002) permitindo sua ligação a receptores ionotrópicos (iGluR) e metabotrópicos (mGluR). Os receptores iGluR são subdivididos em receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico) e cainato. Estes possuem canais iônicos com condutância seletiva para Ca^{2+} e Na^{+} . Uma vez, ativados, ocorre o influxo desses cátions favorecendo a despolarização do neurônio (Dingledine et al., 1999). Já os mGluR iniciam sua cascata de transdução de sinal através de seu acoplamento a proteína G, e dessa forma, são divididos em três grupos: grupo I (mGluR1 e mGluR5), grupo II (mGluR2 e mGluR3) e grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) (Pilc et al., 2008).

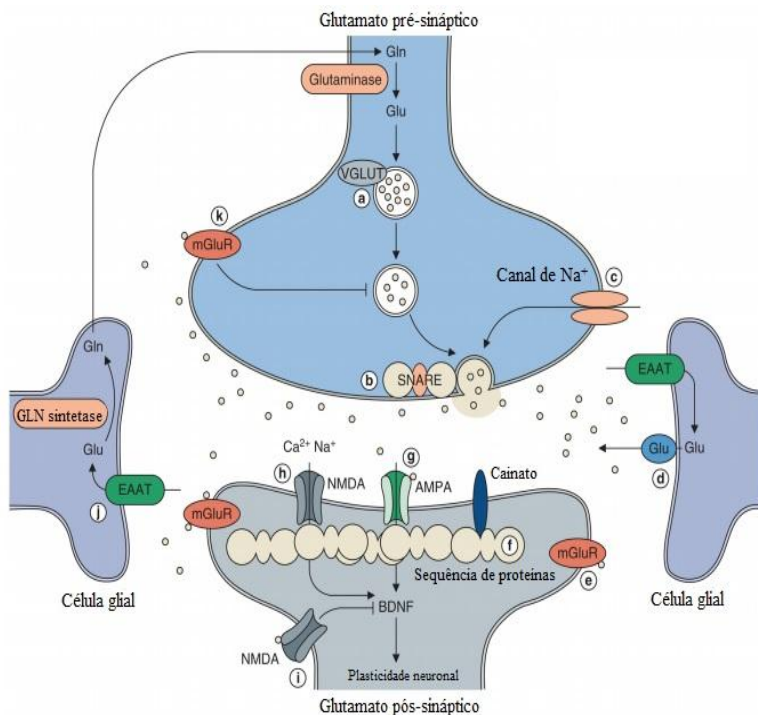


Figura 1 - Representação da sinapse glutamatérgica. Glutamina (Gln) é convertida em glutamato (Glu) através da enzima glutaminase. O glutamato é empacotado em vesículas pré-sinápticas através dos transportadores de glutamato vesicular (VGLUT). Após sua liberação, o glutamato pode se ligar aos seus receptores metabotrópicos (mGluR) ou ionotrópicos (iGluR). O glutamato secretado no espaço extracelular é transportado para o espaço intracelular por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT). Os EAATs estão presentes em astrócitos (célula glial) e em neurônios. Nos astrócitos o glutamato é convertido a glutamina (Gln), a qual é exportada para o espaço extracelular e captada pelos neurônios onde é novamente convertida a glutamato (Adaptado de Niciu et al., 2012).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que a excitação glutamatérgica e a sinalização do receptor NMDA desempenham um papel central na fisiopatologia do TDM (Ghasemi et al., 2014). Neste contexto, evidências de um estudo *póst-mortem* mostraram um aumento nos níveis corticais de glutamato em pacientes com depressão (Hashimoto et al., 2007). Auer e colaboradores (2000) demonstraram uma diminuição nos níveis de glutamato, glutamina e

GABA em pacientes com depressão. Além disso, Sanacora e colaboradores (2004; 2008) também observaram em indivíduos com depressão, um aumento do glutamato cortical juntamente com uma diminuição nos níveis de GABA, além de uma alteração nos receptores NMDA e AMPA em algumas áreas cerebrais. Notavelmente, os antidepressivos tradicionais a base de inibidores de monoaminas se mostraram capazes de regular a expressão e função dos receptores glutamatérgicos (Paul et al., 1994). Tomados em conjunto, estes dados indicam que existe uma alteração da sinalização glutamatérgica nos transtornos de humor e que é necessário a busca de agentes moduladores do sistema glutamatérgico que podem ser promissores para o tratamento da depressão.

1.4 VIA DE SINALIZAÇÃO MTOR E TDM

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma proteína quinase evolutivamente conservada que fosforila o sítio serina/treonina de seus alvos e tem sua ação inibida pela rapamicina, um macrolídeo proveniente de uma bactéria chamada *Streptomyces hygroscopicus*. A extremidade C terminal da mTOR contém um domínio quinase catalítico que, por sua vez, contém pequenas regiões que são locais de fosforegulação chamados domínios regulatórios negativos (NRD) ou domínios repressores (Li et al., 2010). No interior destas regiões, a fosforilação da treonina 2446, serina 2448 e serina 2481 estão vinculadas a altos níveis de atividade da mTOR (Jacinto, 2004). Próximo a este domínio, está o domínio de ligação a rapamicina, em que a ligação de rapamicina à proteína de ligação FK506 (FKBP12) interrompe a interação chave para o funcionamento da mTOR, que controla a tradução pela formação de um complexo sinalizador (Guertin e Sabatini, 2005).

A proteína mTOR é formada por dois complexos protéicos denominados complexo 1 da mTOR (mTORC1) e complexo 2 da mTOR (mTORC2). O mTORC1 modula a tradução em resposta a nutrientes, hormônios e fatores de crescimento e também é composto pela proteína regulatória associada a TOR (Raptor), pela proteína GTPase subunidade β (mLST8) e pela proteína de interação que contém o domínio mTOR (Deptor) que normalmente inibi a mTORC1 (Hoeffler e Klann, 2010). Alguns componentes da mTORC1 também estão presentes na mTORC2, como mLST8 e Deptor. Outras proteínas como a proteína associada à TOR sensível a rapamicina (Rictor), proteína de interação da proteína quinase de mamíferos ativada por estresse

(mSIN1) e a proteína rica em prolina (Protor) são encontradas apenas na mTORC2 (Frias et al., 2006).

Os complexos mTORC1 e mTORC2 fosforilam substratos diferentes e regulam funções distintas. A mTORC2 fosforila membros da família de proteínas quinase AGC, tais como, proteína quinase B (AKT), proteína quinase regulada por glucocorticóides 1 (SGK1) e proteína quinase C (PKC), as quais controlam a sobrevivência celular e a organização do citoesqueleto (Garcia-Martinez et al., 2008). Por outro lado, a mTORC1 estimula o crescimento e a proliferação celular pelo aumento da fase de iniciação da tradução e isto é mediado por dois alvos: a proteína de ligação chamada fator de iniciação de tradução eucariótica 4E (eIF4E) e a proteína quinase S6 (S6K) (Hay e Sonenberg, 2004). Em contrapartida, os mecanismos que induzem ou ativam a cascata de sinalização mTOR ainda permanecem desconhecidos, porém alguns estudos já mostraram que a proteína mTOR pode ser ativada pelos receptores ionotrópicos NMDA e AMPA, pelos receptores metabotrópicos (mGluRs) e pelo receptor do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e pela tirosina quinase (TrKB) (Farber et al, 1998; Li et al, 2010) (Figura 2).

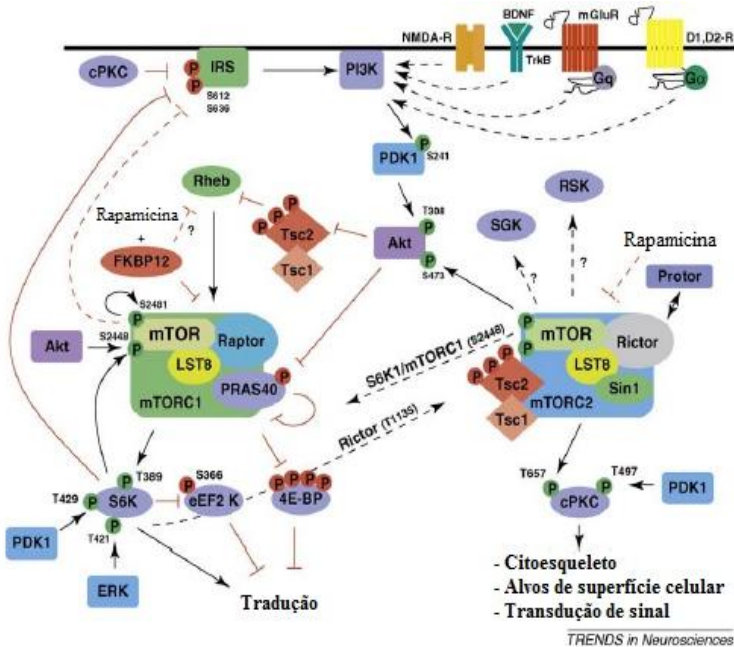


Figura 2 - Via de sinalização mTORC1 e mTORC2. Receptores e canais neurais (NMDA -R, Trk - B, mGluR D1R e D2R) ativam a cascata de sinalização mTORC1. Os receptores e canais neurais que regulam a atividade da mTORC2 é atualmente desconhecido. A atividade da mTORC1 regula vários efetores de tradução (S6K , 4E-BP , eEF2K) e a mTORC2 pode modular a atividade da mTORC1 diretamente (S2448) ou indiretamente (Akt , cPKC , SGK1). O substrato S6K da mTORC1 podem fosforilar Rictor entre os dois complexos TORC. A mTORC1 e mTORC2 regulam vários metabolismos neurais críticos, incluindo a tradução, a estrutura do citoesqueleto, a estabilidade da proteína e a transdução de sinal. Abreviações: P vermelho denota regulação inibitória e P verde denota regulação estimulante (Adaptado de Hoeffler e Klann, 2010).

Recentemente, um estudo mostrou déficits na sinalização da proteína mTOR em pacientes com transtorno bipolar durante a fase depressiva (Machado-Vieira et al., 2015). Além disso, em roedores foi demonstrado que a cetamina induziu uma rápida ativação da cascata mTOR levando a um aumento das proteínas sinápticas e de sinapses CF (Li et al., 2010). Outro estudo relatou que ratos submetidos por oito semanas a um protocolo de estresse crônico apresentaram alterações na via de sinalização da mTOR na amígdala (Chandran et al., 2013).

Hoefffer e Klann (2010) demonstraram que a cetamina produziu um aumento na atividade das proteínas ERK (ERK1 e ERK2) e da proteína quinase B (PKB/AKT) que estão relacionadas com a ativação da sinalização da mTOR.

Além da cetamina, outros fármacos antidepressivos, tais como, a imipramina, um antidepressivo tricíclico, e a fluoxetina, um inibidor da receptação de serotonina, mostraram efeitos na via de sinalização mTOR (Chadran et al., 2013). Jeon et al. (2011) relataram que a administração de imipramina inibiu a sinalização PI3K/AKT/mTOR e Warren et al. (2011) demonstraram que a administração de fluoxetina em combinação com o psicoestimulante metilfenidato induziu um aumento da atividade da mTOR. No entanto, mais estudos são necessários para caracterizar a via de sinalização mTOR na depressão e sua participação nos mecanismos de ação dos antidepressivos.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E TDM

Evidências demonstram que a ativação da inflamação e da via do estresse oxidativo e nitrosativo são fatores fisiopatológicos envolvidos no TDM (Maes et al., 2008). De fato, as respostas inflamatórias são conhecidas por ser acompanhadas por uma indução das vias tanto de estresse oxidativo quanto de estresse nitrosativo (Figura 3) (Maes et al., 2011). Assim, a inflamação e os processos metabólicos mitocondriais são acompanhados pela geração de radicais livres, que são moléculas altamente reativas (Maes et al., 2011).

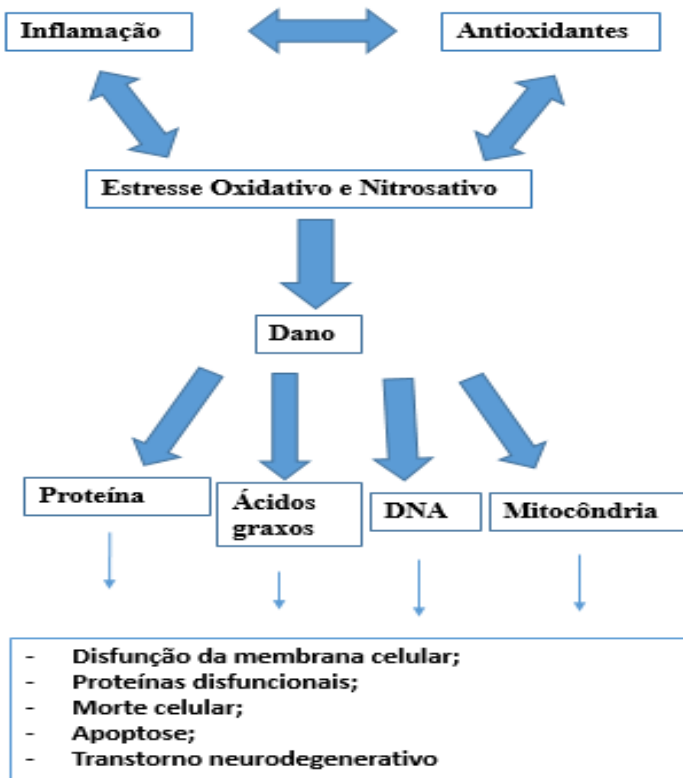


Figura 3 - Vias inflamatórias e de estresse oxidativo e nitrosativo que causam a progressão degenerativa. Processos inflamatórios e uma reduzida capacidade antioxidante, o qual é parcialmente induzido pelo estresse oxidativo e nitrosativo. Os estresses oxidativo e nitrosativo podem aumentar a resposta inflamatória. Assim, levando a um dano em ácidos graxos, proteínas, DNA e mitocôndria, e conseqüentemente, podendo causar disfunções da membrana celular, perda do bom funcionamento das proteínas, morte celular, apoptose e surgimento de transtornos neurodegenerativos (Adaptado de Maes et al., 2011).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), tais com o tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^{\bullet}), óxido nítrico (ON) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), são produzidos em todos os organismos aeróbios e normalmente estão na célula em equilíbrio com moléculas e enzimas antioxidantes (Maes et al., 2011; Suthammarak et al., 2013). As defesas antioxidantes compreendem mecanismos

enzimáticos exercidos pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e a glutationa S transferase (GST). Além da função das enzimas, existem as defesas não enzimáticas exercidas pela glutationa reduzida (GSH), vitamina C, vitamina E, N-acetilcisteína (NAC), entre outros (Pandya et al., 2013).

O estresse oxidativo é uma condição na qual ocorre desequilíbrio entre a produção de radicais livres e defesas antioxidantes (Nordberg e Arner, 2001). Em condições normais, a produção de ERO e de ERN é regulada por sistemas antioxidantes. Porém, quando produzidas em excesso essas espécies podem reagir com ácidos graxos, proteínas e DNA levando assim, à modificações de DNA, proteínas e lipídios, como também, ativação de diferentes fatores de transcrição, com consequente aumento de citocinas, tanto pró, quanto anti-inflamatórias (Birben et al., 2012). Além disso, a produção e o acúmulo das ERO e ERN é um denominador comum em muitas doenças, tais como o TDM, e pode conduzir a um dano celular grave levando a uma disfunção fisiológica e até a morte celular (Scandalios, 2005).

De fato, alguns estudos prévios, tanto em humanos quanto em modelos animais, já relataram a associação entre o TDM e o estresse oxidativo. Bilici e colaboradores (2001) mostraram um aumento das ERO no plasma de pacientes com TDM. Porém, um fator importante é que o desbalanço oxidativo em pacientes com TDM foi reduzido após o tratamento com antidepressivos clássicos (Bilici et al., 2001; Behr et al., 2012; Lee et al., 2013). Já em modelos animais, um estudo mostrou que ratos submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado (ECM) tiveram aumento na produção de superóxido, no hipocampo, CF e córtex cerebral e de TBARS no córtex (Lucca et al., 2009a). Também já foi demonstrado que ratos submetidos ao TDM tiveram um aumento na carbonilação de proteínas no CF, hipocampo, estriado e córtex; nos níveis de TBARS no cerebelo e estriado; na atividade da CAT no cerebelo, hipocampo, estriado e córtex e uma diminuição na atividade da SOD no CF, estriado, hipocampo e córtex (Lucca et al., 2009b). Todavia, outro estudo relatou que a utilização de antidepressivos como harmina, um inibidor de monoamina oxidase, e imipramina, um antidepressivo tricíclico, promoveram efeitos antioxidantes no CF, corroborando outros estudos acerca da atividade antioxidante de antidepressivos (Réus et al., 2010). Outros estudos também observaram que a utilização da cetamina foi capaz de diminuir os danos oxidativos e promover defesas antioxidantes em modelos animais de depressão (Réus et al., 2015a, b; 2016).

1.6 ESTRESSE DO RETÍCULO E TDM

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela presente nas células eucarióticas e pode ser classificado em dois tipos morfológicos que apresentam funções organizacionais distintas: retículo endoplasmático rugoso (RER) e retículo endoplasmático liso (REL). Ambos são constituídos por um sistema membranoso que se ramifica ao longo do citoplasma, comunicando o espaço perinuclear, complexo de Golgi e lisossomos por meio de vesículas. A característica marcante do RER é a presença de ribossomos aderidos a sua membrana (Carvalho e Recco-Pimentel, 2007).

O RER é o principal local de enovelamento de proteínas nas células. Este processo de enovelamento é composto por uma série de mecanismos como, dobramento, montagem, formação de pontes de dissulfetos e glicosilação de proteínas. O dobramento de proteínas é um processo importante e responsável pela conversão de cadeias lineares de polipeptídios em estruturas tridimensionais, permitindo que as proteínas se tornem funcionais. Alterações no metabolismo celular podem prejudicar o dobramento ideal, formando proteínas imaturas (Walter e Ron, 2011).

O acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE pode resultar em um aumento súbito na demanda da síntese proteica, de distúrbios na glicosilação, de perturbações na concentração de cálcio e também da sobrecarga de nutrientes (Walter e Ron, 2011). Caso estas condições reprimam a capacidade da organela de restaurar a síntese proteica, gera-se o chamado estresse de retículo (ER) (Lionetti et al., 2009).

Em resposta a esse desequilíbrio, ou antes mesmo do estabelecimento deste, diversos mecanismos são ativados, visando o restabelecimento da homeostase da síntese proteica. Frente ao estresse vigente, são ativadas vias adaptativas conhecidas coletivamente como resposta a proteínas não-enoveladas (UPR; unfolded protein response) (Hotamisligil, 2006; Ron e Walter, 2007). Neste contexto, três proteínas residentes da membrana do RE são sequencialmente ativadas: a quinase do retículo endoplasmático semelhante à proteína quinase do pâncreas (PERK), enzima ativada por inusitol 1 (IRE1) e o fator 6 ativador de transcrição (ATF6) (Figura 3). A ativação destas proteínas promove uma cascata de sinalização intracelular que pode resultar na redução dos fatores de iniciação de tradução, assim como elevação da transcrição gênica (Calfon et al., 2002; Chen et al., 2002). Essas alterações têm por

finalidade reverter o estado de estresse do retículo através da redução da atividade ribossomal.

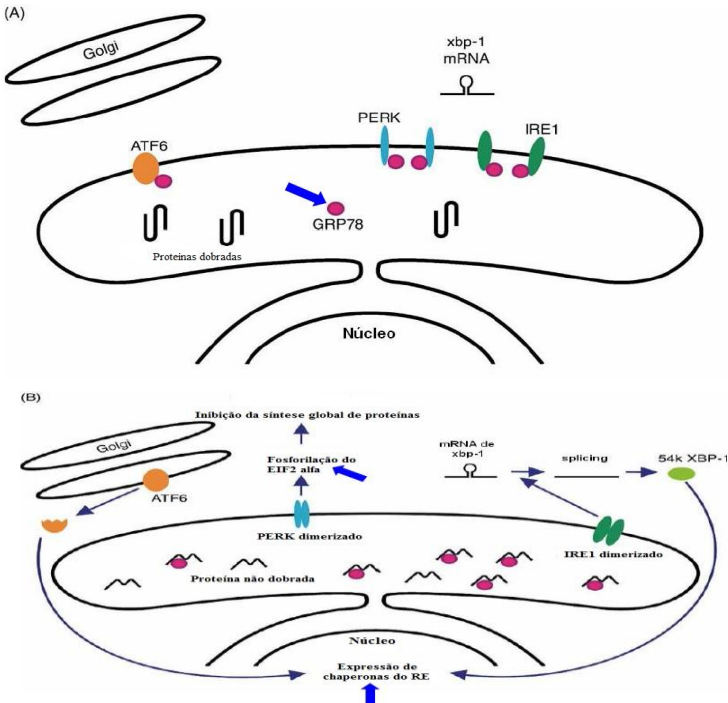


Figura 4 - Vias de tradução do sinal ativado pelo ER. **(A)** Em condições de equilíbrio no lúmen do RE, quando a capacidade de enovelamento e processamento protéico se mantém de acordo com a síntese de polipeptídeos, a chaperona GRP78 está associada com as proteínas transmembranas do RE (PERK, IRE1 e ATF6), resultando na supressão da atividade enzimática destas proteínas. **(B)** Em condições de ER, quando a quantidade de proteínas mal enoveladas excede os níveis de GRP78 livre no lúmen do RE, esta chaperona se dissocia da ATF6, PERK e IRE1 para aumentar a capacidade de enovelamento. A dissociação da GRP78 da PERK e IRE1 leva a oligomerização, autofosforilação e ativação destas proteínas. Quando ativada, PERK fosforila a subunidade α de eIF2, resultando na inibição global da síntese protéica, enquanto IRE1 ativada cliva um mRNA que codifica um fator de transcrição específico da URP, XBP1, aumentando a atividade transcripcional de genes alvos da URP. Já o ATF6, depois da dissociação de GRP78, se transloca para o complexo de golgi, onde é clivado por proteases para formar o fator de ativação que induz a expressão de genes relacionados à resposta ao ER, incluindo GRP78 (Adaptado de Paschen e Mengesdorf, 2005).

Quando ativada a PERK fosforila o aminoácido serina-51 da subunidade α da proteína fator de iniciação de tradução eucariótico 2 α (eIF2), inibindo a EIF2 α e assim, a tradução de mRNA (Harding et al., 1999). Neste sentido, a via PERK contribui para a redução do fluxo de proteínas no RE, aliviando o estresse. Entretanto, alguns mRNAs contendo fases abertas de leitura em regiões não traduzidas são preferencialmente traduzidos quando o eIF2 α é limitado. Um destes mRNAs codifica o fator de transcrição ATF4. Dois genes alvos de ATF4 importantes são: a proteína homóloga C/EBP (CHOP) e o gene de parada de crescimento e indução de dano ao DNA 34 (GADD34 (Walter e Ron, 2011). CHOP é um fator de transcrição que controla genes que codificam componentes envolvidos com a apoptose. Assim, a via PERK contribui para a proteção na UPR, mas também pode ativar sinais de vias de morte celular programada. Provavelmente, esta ação dupla da PERK é influenciada pelos níveis de eIF2 α fosforilado, o que pode ser demonstrado pelos efeitos de suas fosfatases específicas (Walter e Ron, 2011). Já o GADD34, outro gene alvo de ATF4, codifica uma subunidade da proteína fosfatase PP1C que neutraliza a PERK pela desfosforilação de eIF2 α . A inibição do complexo GADD34-PP1C protege as células contra o ER, prolongando os níveis de eIF2 α fosforilado (Marciniak et al., 2004; Tsytlar et al., 2011). Porém, a deleção da fosfatase constitutiva de eIF2 α causa efeitos letais (Harding et al., 1999), mostrando a importância da regulação balanceada da desfosforilação de EIF2 α .

A IRE1 é uma proteína transmembrana bifuncional (cinase/endoribonuclease), que utiliza um mecanismo não convencional de *splicing* de mRNA para iniciar a UPR. Sua função ribonuclease é ativada por mudanças conformacionais que ocorrem após a oligomerização e transfosforilação de IRE1 na membrana do RE. A IRE1 ativada cliva um mRNA que codifica um fator de transcrição específico da UPR, o XBP1. Este se liga ao ERSE (elementos de resposta ao ER), aumentando a atividade transcricional dos genes da UPR (Schroder, 2006). Porém, ainda não é bem estabelecido com IRE1 é ativada pelo ER. Uma das hipóteses é que seja através da dissociação da GRP78 (Bertolotti et al., 2000), como ocorre com a PERK e a ATF6. Mas, há um estudo que sugere que IRE1 é ativada diretamente por proteínas mal enoveladas através da interação destas com uma espécie de sulco no domínio luminal, o que estimularia a formação de oligômeros e consequente ativação da porção citoplasmática de IRE1 (Credle et al., 2005).

A ATF6 é um fator de transcrição que é inicialmente sintetizado como uma proteína transmembrana do RE. Quando há um acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, esta proteína é transportada para o complexo de golgi, onde é clivada por proteases, que removem o domínio luminal e a porção transmembrana, produzindo um domínio citoplasmático livre, o qual é um fator de transcrição ativo. Este fator de transcrição, então, se transloca para o núcleo, onde se liga à região promotora ERSE, resultando na ativação de genes alvo da UPR, incluindo os genes que transcrevem as chaperonas (Lai et al., 2007; Walter e Ron, 2011). O domínio luminal de ATF6, além de interagir com a GRP78, contém pontes dissulfeto intra- e intermoleculares que podem monitorar o ambiente do RE, como sensor redox, e contribuir para a ativação desta via (Walter e Ron, 2011).

Estudos mostram que existe uma relação entre o estresse do retículo com o TDM. De fato, Bown e colaboradores (2000) revelaram que chaperonas GRP78 e GRP94 estão aumentadas no córtex temporal de indivíduos com o TDM. Além disso, em um modelo animal de estresse crônico, as proteínas relacionadas ao ER foram elevadas, e este efeito foi atenuado após a utilização da amitriptilina, um antidepressivo tricíclico (Gourley et al., 2008). Além disso, Ishisaka e colaboradores (2011) relataram que o estresse aumenta a restrição na expressão de genes relacionados ao RE. Dessa forma, estes resultados sugerem que o ER pode estar relacionado com a fisiopatologia do TDM.

1.7 LIGAÇÕES ENTRE A CASCATA DE SINALIZAÇÃO MTOR E O ESTRESSE DO RE

Alguns estudos têm mostrado uma relação entre o RE e cascata de sinalização mTOR. Kato e colaboradores (2012) e Nakajima e colaboradores (2011) destacaram que em algumas situações patológicas a toxicidade celular causada pelo estresse do RE estão relacionadas à ativação crônica do mTORC1. Isto implica em um aparente paradoxo em que em condições específicas, a proteína mTOR que é uma reguladora de crescimento e divisão celular, também pode sinalizar a morte da célula (Appenzeller-Herzog e Hall, 2012). Além disso, a via de resposta à proteínas não-enoveladas pode ocorrer acima ou abaixo da via de ativação da mTORC1, o que designa a mTORC1, pelo menos em algumas situações, como um componente no processo de morte celular induzida pelo estresse do RE.

A cascata que melhor representa a ativação das proteínas não-enoveladas através da indução da via abaixo da mTORC1 é a IRE1 α -quinase reguladora de sinal de

apoptose 1 (ASK1)-quinase N-terminal c-Jun (JNK) (Figura 4), no qual, a constitutiva ativação da mTORC1 pela perda do complexo da esclerose tuberosa 1 (TSC1) e do complexo da esclerose tuberosa 2 (TSC2) estimula a JNK, que contribui para a indução da apoptose através do estresse do RE (Kato et al., 2012; Bachar et al., 2009; Ozcan et al., 2008). Deste modo, com a JNK ativada, este pode participar no desenvolvimento da resistência à insulina (Ozcan et al., 2008), ocorrendo em paralelo a outros mecanismos, como a facilitação da lipogênese (Jurczak, et al., 2012), a ativação da PKR (Nakamura et al., 2010) e a ocorrência do *feedback* negativo mTORC1-S6K1- substrato 1 do receptor da insulina (IRS1) (Tremblay et al., 2007; Um et al., 2004). Consistente com sinalização apoptótica através da via mTORC1 - Ire1 α - ASK1 - JNK, a superexpressão ou redução do Rheb aumenta ou antagoniza estímulos apoptóticos em uma forma dependente da ASK1 (Karassek et al., 2010).

Além disso, a indução farmacológica da via de resposta a proteínas não-enoveladas, ativa rapidamente o eixo de sinalização fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-quinase (PI3K-do inglês) -Akt - mTORC1 (Di Nardo et al., 2009; Li et al., 2011; Kato et al., 2012;) que depende especificamente da ATF6 α (Yamazaki et al., 2009). No entanto, o tratamento prolongado com – agentes indutores do estresse do RE, inibe a Akt (Hu et al., 2004; Hosoi et al., 2007; Di Nardo et al., 2009; Yamazaki et al., 2009; Ishigaki et al., 2010) e o mTORC1 (Deldicque et al., 2011; Nakajima et al., 2011), que está, pelo menos em parte, atribuído ao *feedback* negativo do mTORC1 - S6K1 - IRS1 (Deldicque et al., 2011; Nakajima et al., 2011). Além disso, a via PERK-CHOP induz o inibidor da Akt, o fator de ligação de repetição do telômero 3 (TRB3) (Du et al., 2003; Ohoka et al., 2005) e a inativação do mTORC2 pela glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β) que também podem contribuir para a inibição da Akt durante a fase avançada do estresse do RE.

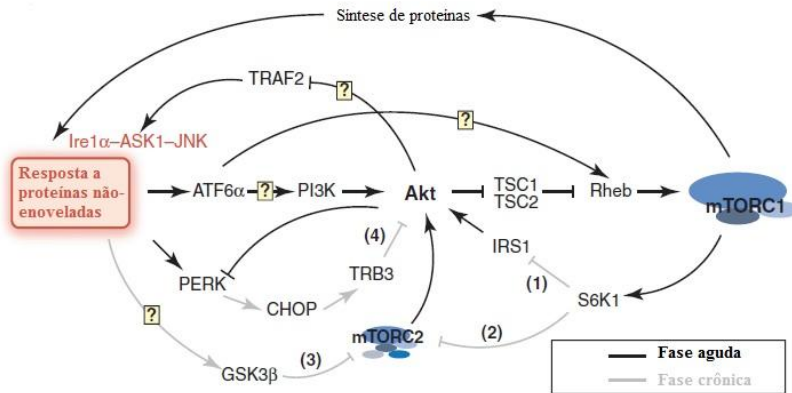


Figura 5 - Interação entre a via de resposta a proteínas não-enoveladas e mTORC1. As vias de sinalização conhecidas que ligam a via de resposta a proteínas não-enoveladas a ativação do mTORC1 pode ser subdividida em duas fases: a fase aguda (representada em linhas pretas) e a fase crônica (representada em linhas cinzas). A via de resposta a proteínas não-enoveladas pode ativar a mTORC1 via ativação do ATF6 α . Assim, o ATF6 α leva a ativação da via PI3K, assim ativando a Akt; e também aumenta os níveis de Rheb por mecanismos ainda não conhecidos. A ativação aguda da via de resposta a proteínas não-enoveladas pelo mTORC1 ocorre através do aumento da síntese de proteínas, o qual ativa as proteínas do ER levando ao enovelamento das proteínas. A ativação crônica do mTORC1 e da via de resposta a proteínas não-enoveladas provoca a inativação da Akt, por meio de quatro mecanismos: (1) fosforilação supressora do IRS1; (2) inibição da mTORC2 através do S6K1; (3) inibição da mTORC2 através da GSK3 β ; (4) ativação da PERK-CHOP que induz o TRB3, assim bloqueando a Akt. A redução da ativação da Akt aumenta os níveis de TRAF2, ativando a via IRE1 α -ASK1-JNK do estresse do RE (Adaptado de Appenzeller-Herzog e Hall, 2012).

Dada a interdependência da mTORC1 e a via de resposta a proteínas não-enoveladas durante o estresse do RE, é importante considerar que existem processos biológicos comuns e que estes são provavelmente fundamentais para a manutenção das células (Figura 6), como por exemplo, o sinergismo que ocorre entre o mTORC1 e a via de resposta a proteínas não-enoveladas durante a regulação da síntese de lipídeos hepáticos (Lee et al., 2008; Peterson et al., 2011), na angiogênese (Thomas et al., 2006), na sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Dan et al., 2008) e na resistência a insulina (Um et al., 2004; Ozcan et al., 2008). Por outro lado, as duas vias emitem sinais

contraditórios quanto ao controle da biogênese do ribossomo (Mayer et al., 2004; DuRose et al., 2009) na tradução de proteínas (Zoncu et al., 2011), na apoptose (Tabas et al., 2011) e na autofagia (Zoncu et al., 2011).

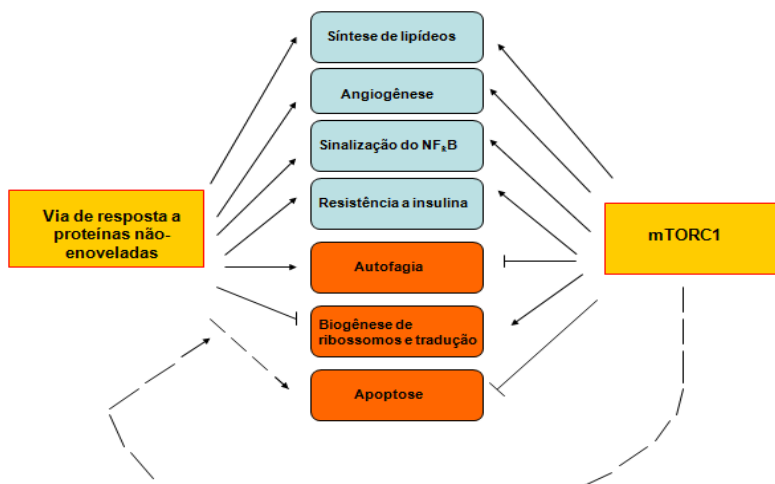


Figura 6 - Os processos biológicos da via de resposta a proteínas não-enoveladas e o mTORC1 podem ser sinérgicos ou antagônicos. A regulação positiva ocorre na síntese de lipídeos, na angiogênese, na resistência a insulina e na ativação da via NF-κB. Em contraste, a autofagia é estimulada pela via de resposta a proteínas não-enoveladas e inibida pelo mTORC1, já a biogênese dos ribossomos e a tradução de proteínas são inibidas pela via de resposta a proteínas não-enoveladas e ativadas pelo mTORC1. Em relação a apoptose, a interação entre a via de resposta a proteínas não-enoveladas e o mTORC1 pode ser dependente do contexto. Na primeira fase (processo fisiológico) do estresse do RE a ativação da via de resposta a proteínas não-enoveladas pode ser homeostática/antiapoptótica. Já na fase crônica, a via de resposta a proteínas não-enoveladas promove a apoptose das células (linha preta tracejada). De igual modo, depois de um estímulo e/ou estresse RE prolongado, o mTORC1, que geralmente promove a sobrevivência celular, também pode contribuir para a sinalização da apoptose através da interação com a via de resposta a proteínas não-enoveladas (Adaptado de Appenzeller-Herzog & Hall, 2012).

1.8 CETAMINA E TDM

A cetamina é um derivado do cloridrato de fenciclidina (phencyclidine hydrochloride – PCP) (Micallef et al., 2003), sintetizado

por Stevens em 1965 e tendo como principal uso a anestesia em humanos e animais. É referida na literatura como um “anestésico dissociativo”, devido a uma perda sensorial marcante e analgesia, assim como amnésia e paralisia do movimento, sem perda real da consciência (Kohrs e Durieux, 1998). A cetamina é usada no trauma e em procedimentos cirúrgicos de emergência, bem como na medicina veterinária (Wagner et al., 2002). A neurofarmacologia da cetamina é complexa, uma vez que a mesma interage com vários tipos de receptores em diversos locais de ligação, incluindo os receptores de glutamato, tanto NMDA quanto não-NMDA; opióides; gabaérgicos; serotoninérgicos; além de agir, direta ou indiretamente, sobre as monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) (Wagner et al., 2002).

Há duas formas isoméricas da cetamina, a S (+) e R (-), que apresentam propriedades farmacológicas diferentes (Luft e Mendes, 2005). De fato, estudos tem demonstrado que a cetamina S (+) apresenta mais afinidade ao sítio fenciclidina no receptor NMDA que a cetamina R (-) (Kohrs e Durieux, 1998; Pfenninger et al., 2002). Além disso, a cetamina é agonista do receptor opióide acoplado a proteína G, e seus efeitos psicomiméticos podem ser explicados pela interação com o receptor kappa opióide (Hustveit et al, 1995; Raeder e Stenseth, 2000). Com a disponibilidade do isômero S (+) e o potencial de causar menos efeitos psicomiméticos, a cetamina tem sido amplamente utilizada também pelas suas propriedades antidepressivas.

Um estudo mostrou que a cetamina foi capaz de inibir o receptor NMDA e que infusões sub-anestésica de cetamina (0,5 mg/kg durante 40 minutos) diminuíram os sintomas depressivos em pacientes resistentes a outros tratamentos (Berman et al., 2000). Murrough et al. (2013) mostraram que os efeitos antidepressivos de uma única dose de cetamina perduraram por até sete dias e a resposta antidepressiva foi mantida por semanas através de infusões repetidas. Evidências sugerem também que a administração aguda e crônica de cetamina exerce efeitos antidepressivos rápidos e prolongados em distintos modelos animais de depressão, tais como o teste do desamparo aprendido, teste de natação forçada e anedonia (Chatuverdi et al., 2001; Garcia et al., 2008a, b; Maeng e Zarate, 2008; Réus et al., 2015a,b). Diversos estudos pré-clínicos demonstraram que antagonistas dos receptores NMDA, como o MK-801, o AP7, o CPP, e outros exibem efeitos ansiolíticos e antidepressivos em ratos (Krystal et al., 1994). Ainda, uma dose aguda de cetamina aumentou os níveis de BDNF no hipocampo (Garcia et al., 2008a, b). O BDNF é uma neurotrofina que está associada ao TDM e à respostas antidepressivas. De fato, um estudo prévio mostrou que a

cetamina reverteu o aumento dos níveis de corticosterona e a diminuição dos níveis de BDNF em animais submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado (Garcia et al., 2009).

O efeito antidepressivo da cetamina também parece estar envolvido com o receptor AMPA. De fato, uma única injeção de cetamina na dose de 10 mg/kg combinado com fluoxetina e olanzapina, um antipsicótico, aumentou a indução dos receptores AMPA e NMDA, porém esses efeitos foram mais evidentes nos receptores AMPA (Björkholm et al., 2015). Além disso, a inibição do receptor AMPA pelo 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahidrobenzo [f] quinoxalina-7-sulfonamida (NBQX) foi capaz de bloquear os efeitos antidepressivos da cetamina no teste do nado forçado (Koike e Chaki, 2014), sugerindo que o receptor AMPA é necessário para efeitos antidepressivos de cetamina. Nishitami e colaboradores (2014) também demonstraram que a inibição do receptor AMPA foi capaz de bloquear a liberação de serotonina induzida pela cetamina no CF de ratos.

Alguns estudos já demonstraram que a cetamina é capaz de modular e exercer efeitos antidepressivos via GSK-3. De fato, a GSK-3 induziu efeitos sinaptogênicos e antidepressivos após o tratamento com cetamina combinado com lítio, um estabilizador do humor que age nesta proteína (Beurel et al., 2011; Liu et al., 2013). Yang e colaboradores (2012), em um estudo clínico, mostraram que a cetamina na dose de 0,5 mg/kg melhorou os sintomas depressivos e aumentou os níveis de mTOR, GSK-3 e eFF2K no plasma de pacientes com TDM. Porém, apesar de a cetamina ter apresentado eficácia terapêutica em diversos estudos, os mecanismos moleculares responsáveis por tais efeitos antidepressivos ainda permanecem obscuros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração de cetamina após a inibição da via de sinalização celular mTOR no CF de ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o tempo de imobilidade através do teste do nado forçado em ratos Wistar após a inibição da via mTOR no CF e tratados com cetamina;
- b) Avaliar a expressão das proteínas mTOR, EF2K e 4E-BP1 em tecido cerebral de ratos Wistar após a inibição da via mTOR no CF e tratados com cetamina;
- c) Avaliar a expressão das proteínas relacionadas ao estresse de retículo: PERK, IRE1-alfa, CHOP, em ratos Wistar após a inibição da via mTOR no CF e tratados com cetamina;
- d) Avaliar os níveis de TBARS, carbonilação de proteínas e atividade da enzima mieloperoxidase em tecido cerebral de ratos Wistar após a inibição da via mTOR no CF e tratados com cetamina;
- e) Avaliar a concentração de nitrito/nitrato em tecido cerebral de ratos Wistar após a inibição da via mTOR no CF e tratados com cetamina;
- f) Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em tecido cerebral de ratos Wistar após a inibição da via mTOR no CF e tratados com cetamina;
- g) Avaliar os níveis das citocinas pró-inflamatórias: TNF- α , IL-1 β e IL-6 no soro de ratos Wistar após a inibição da via mTOR no CF e tratados com cetamina.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e comportamento (SBNeC). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 031-2014-01.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Nesse estudo foram utilizados 40 ratos Wistar machos adultos pesando entre 250-300g provenientes do biotério da UNESC. Os animais foram acondicionados em cinco por caixa, com ciclo claro/escuro de 12 horas (06:00 às 18:00), comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido à temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com tiopental 25 mg/kg e xilasina 30 mg/kg intra-muscular. No aparelho estereotáxico foram removidos a pele e o couro cabeludo do rato na região do crânio. A implantação das cânulas guia (22 gauge) no CF, dos dois hemisférios, foi na região medial de acordo com Paxinos & Watson (1998), mediante as coordenadas: 3.2 mm antero-posterior ao bregma, 0.6 mm médio lateral, 1.5 mm dorso-ventral. As cânulas foram em seguida fixadas ao crânio comacrílico dental. Os animais ficaram em repouso durante três dias antes das próximas etapas do experimento.

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Ratos Wistar machos adultos foram randomizados em 4 grupos (n=10 por grupo) (Figura 7): 1) veículo + sal 2) veículo + cetamina 15 mg/kg; 3) rapamicina + salina; 4) rapamicina + cetamina 15 mg/kg. Posteriormente, foi realizado o procedimento cirúrgico para os animais receberem o inibidor farmacológico rapamicina na dose de 0,2 nmol (Li et al., 2010) ou veículo (grupo controle) que foi administrado diretamente no CF 1 h antes do teste comportamental. A administração

dos fármacos cetamina na dose de 15 mg/kg (Réus et al., 2016) ou salina foram intraperitoneais e realizadas 30 min após a administração da rapamicina e 30 min antes do teste comportamental. Os tempos de imobilidade, nado e escalada foram avaliados através do teste do nado forçado (n=10 por grupo). Após os ratos foram mortos por decapitação e o CF, hipocampo, amígdala e NAc foram removidos para as análises bioquímicas.

- 1) Veículo + Salina;
- 2) Rapamicina + Salina;
- 3) Veículo + Cetamina (15 mg/kg);
- 4) Rapamicina + Cetamina (15 mg/kg).

n = 10 animais por grupo para comportamento

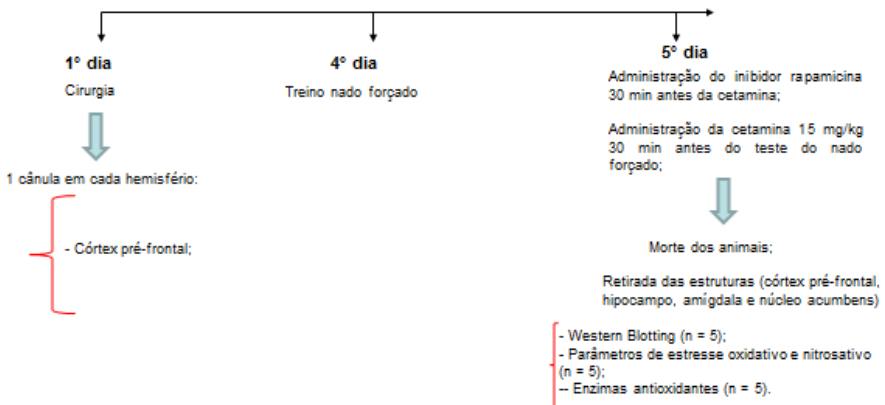


Figura 7 - Esquema do desenho experimental.

3.5 TESTE COMPORTAMENTAL

3.5.1 Teste do nado forçado

Este teste consiste em dois dias de procedimentos no qual cada rato é posto em um cilindro com água a 23° C, a água deve ser suficiente para o animal não conseguir apoiar as patas no fundo. No período de treino, os animais foram forçados a nadar durante 15 minutos. No dia seguinte, (24 horas após o treino) no período de teste, cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos. Foram avaliados os parâmetros de imobilidade, nos quais incluem imobilidade total ou

movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar, parâmetros de nado, que incluem movimentos horizontais através da superfície da água, e parâmetros de escalada, movimentos verticais contra as paredes (Porsolt et al., 1977).

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Preparação do tecido e homogenado

Amostras de tecidos do CF, hipocampo, amígdala e o NAc foram homogeneizados (1:10, w/v) em tampão SETH, pH 7,4 (250 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, 10 mM base Trizma, 50 UI/mL de heparina). Os homogenados foram centrifugados a 800 x g durante 10 minutos a 4^o C. Os sobrenadantes foram mantidos a -80^o C, até serem usados para a determinação da atividade enzimática. O intervalo máximo entre a preparação do homogenado e a análise enzimática foi sempre inferior a cinco dias. O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Lowry et al. (1951). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

3.6.2 Procedimentos de análise de estresse oxidativo

3.6.2.1 Atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase é um marcador importante para medir a infiltração de neutrófilos (De Young et al., 1989). Os tecidos cerebrais foram homogeneizados (50 mg/ml) em brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5% e centrifugados a 15,000 x g durante 40 minutos. A suspensão foi sonicada por três vezes durante 30s. Uma alíquota do sobrenadante foi misturada com uma solução de 1,6 mM de tetrametilbenzidina e de H₂O₂. A atividade foi medida espectrofotometricamente como a variação de absorbância em 650 nm a 37^oC. Os dados foram representados como mU por mg de proteína.

3.6.2.2 Formação de TBARS

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de TBARS (Esterbauer e Cheeseman 1990). As amostras de tecido cerebral foram lavadas com PBS, colhidas e lisadas. As espécies reativas foram obtidas por hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetra-etoxi-propano (TEP) e foram utilizadas como padrão para a quantificação de TBARS. A cada tubo foi adicionado TBA a 0,67% e em seguida foram agitados. A mistura da reação foi incubada a 90°C durante 20 minutos e posteriormente as amostras foram colocadas em gelo. A densidade óptica de cada solução foi medida em um espectrofotômetro a 535 nm. Os dados foram expressos como nmol de equivalente malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

3.6.2.3 Formação de proteínas carbonil

O dano oxidativo em proteínas teciduais foi determinado pela medida de grupos carbonil. O conteúdo de proteínas carboniladas foi medido nas amostras homogeneizadas de cérebro utilizando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) em um ensaio espectrofotométrico (Levine et al., 1990). Amostras de tecidos foram sonicadas em homogeneização gelada de tampão contendo inibidores de fosfatase e de protease (200 nM caliculina, 10 µg/ml de leupeptina, 2 µg/ml de aprotinina, 1 mM de ortovanadato de sódio e 1 µM microcistina-LR) e centrifugadas a 1000 x g durante 15 minutos para sedimentar o material insolúvel. Trezentos microlitros de alíquotas do sobrenadante contendo 0,7-1,5 mg de proteína foram tratados com 300 µl de 10 mM de DNPH, dissolvido em HCl a 2M, e comparado com 2M de HCl sozinho (reagente branco). Em seguida as amostras foram incubadas no escuro sob agitação a cada 10 minutos, durante uma hora e à temperatura ambiente. As amostras foram precipitadas com ácido tricloroacético (concentração final de 20%) e centrifugadas a 16,000 x g a 4°C, durante 15 minutos. O sedimento foi lavado por três vezes com 1 ml de etanol/acetato de etil (1:1 v/v). Os sedimentos foram seguidamente levemente agitados em vórtice e após, expostos à solução de lavagem durante 10 minutos antes da centrifugação (16,000 x g, durante 5 minutos). O sedimento final foi dissolvido em 1 ml de guanidina 6M e 10 mM de tampão fosfato trifluoroacético ácido, pH 2,3. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 16,000 x g, por 5 minutos. Absorbância foi registrada em um espectrofotômetro a 370 nm, tanto para as amostras tratadas com DNPH, quanto para o HCl sem DNPH.

Os níveis de proteínas carboniladas foram expressos como nmol de carbonil por mg de proteína.

3.6.2.4 Atividade da enzima SOD

A estimativa da SOD foi realizada com base em sua capacidade para inibir espontaneamente a oxidação da adrenalina para adrenocromo (Bannister e Calabrese, 1987). Uma combinação de 2,78 ml de tampão carbonato de sódio (0,05 mM; pH 10,2), 100 µl de EDTA (1,0 mM), e 20 µl do sobrenadante ou sacarose (branco) foi incubada a 30°C, durante 45 minutos. Em seguida, a reação foi iniciada após adição de 100 µl de solução de adrenalina (9,0 mM). A variação na absorbância foi registrada a 480 nm, durante 8 minutos. Durante todo o procedimento do ensaio, a temperatura foi mantida a 30°C. Uma unidade de SOD produziu aproximadamente 50% de auto-oxidação de adrenalina. Os resultados foram expressos em unidades/mg de proteína.

3.6.2.5 Atividade da enzima CAT

A atividade da CAT foi medida através do método que utiliza o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para gerar H₂O e O₂ (Aebi 1984). As amostras de tecido cerebral foram sonicadas em 50 mmol/l de tampão fosfato (pH 7,0). A suspensão resultante foi centrifugada a 3000 x g, durante 10 min. A alíquota de amostra (20 µl) foi adicionada a 980 µl da mistura de substrato. A mistura de substrato continha 0,3 ml de H₂O₂ em 50 ml de tampão fosfato a 0,05 M (pH 7,0). As absorbâncias inicial e final foram registradas a 240 nm, após 1 e 6 minutos, respectivamente. Uma curva padrão foi estabelecida, utilizando-se catalase purificada (Sigma, MO, EUA) nas mesmas condições.

3.6.3 Procedimentos de análise de estresse nitrosativo

3.6.3.1 Medida da concentração de nitrito/nitrato

As concentrações totais de nitrito foram medidas através da reação de Griess. A reação consiste em adicionar 100 µl de reagente de Griess 0,1% (w/v) naftil etilenediamida dicloridrato em H₂O e 1% (w/v) de sulfanilamida em 5% (v/v) de H₃PO₄ concentrado, vol. [1:1] para a amostra de 100 µl. A absorbância foi registrada em um espectrofotômetro a 550 nm (Green et al., 1982). Os resultados foram

registrados como nmol da concentração de nitrito/nitrato por mg de proteína.

3.6.4 Quantificação de proteínas por Western blotting

Foram analisados em amostras de CF, hipocampo, amígdala e o NAC o imunoconteúdo das proteínas mTOR, 4EBP1, CHOP, eEF2K, PERK, IRE1-alfa. Para tal análise, as proteínas foram isoladas através de eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose (Leal et al., 2002). As proteínas de interesse foram identificadas através do uso de anticorpos específicos anti-mTOR, anti-p4EBP1, anti-CHOP, anti-peEF2K, anti-PERK e anti-IRE1-alfa e quantificadas por densitometria das bandas (Leal et al., 2002, 2006). A revelação dos blottings foi realizada através de ECL (anticorpo secundário ligado à peroxidase) e pela coloração usando NBT/BCIP (anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina).

As densidades ópticas (DOs) das bandas foram quantificadas utilizando-se o programa Image Lab®. Os níveis de imunoconteúdos de mTOR, 4EBP1, CHOP, eEF2K, PERK, IRE1-alfa foram determinados pela razão da DO das bandas totais.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estão apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). As diferenças entre os grupos experimentais na avaliação do TNF e de todos os ensaios bioquímicos foram determinadas por análise de variância de uma via (ANOVA). Quando o valor de F foi significativo, foi realizado o teste post hoc de Tukey. A significância estatística foi considerada para valores de p menores do que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO TESTE DO NADO FORÇADO (TNF)

A Figura 8 ilustra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no córtex pré-frontal em ratos Wistar submetidos ao TNF. A cetamina na dose de 15 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade, em comparação com o grupo veículo tratado com salina e a administração do inibidor rapamicina foi capaz de bloquear os efeitos antidepressivos da cetamina ($F_{(3-40)} = 4.419$; $p = 0.009$; Fig. 8). A análise estatística não mostrou nenhuma diferença significativa nos grupos veículo e rapamicina no tempo de escalada ($F_{(3-40)} = 3.070$; $p = 0.05$; Fig. 8) e no tempo de nado ($F_{(3-40)} = 2.708$; $p = 0.059$; Fig. 8).

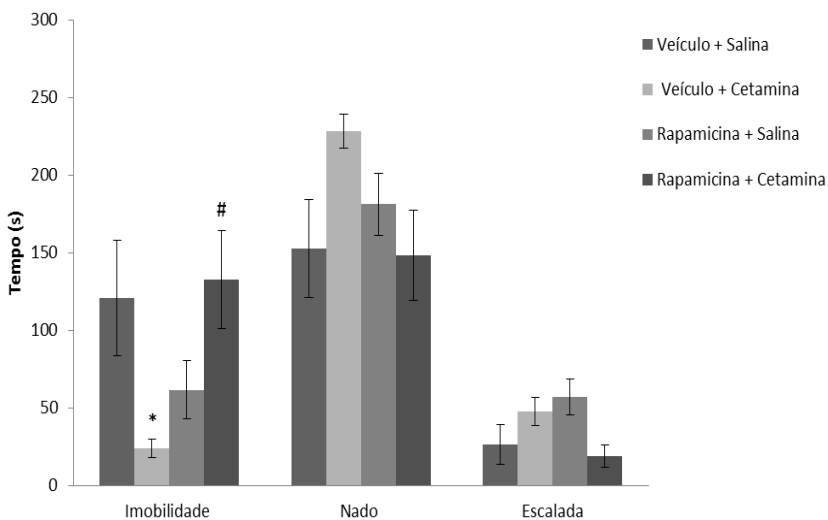


Figura 8 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os tempos de imobilidade, nado e escalada no TNF. As barras representam média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina de acordo com ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

4.2 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NOS NÍVEIS DE TBARS, NA FORMAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONIL, NA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO/NITRATO E NA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM DIFERENTES ESTRUTURAS CEREBRAIS

A Figura 9 aponta os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no córtex pré-frontal sobre os níveis de TBARS no CF, amígdala, hipocampo e núcleo NAc. Os níveis de TBARS foram aumentados no CF no grupo veículo tratado com cetamina, em comparação com o grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-19)} = 5.891$; $p = 0.007$; Fig. 9). No hipocampo, os níveis de TBARS aumentaram no grupo veículo tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina e diminuíram nos grupos rapamicina tratados com salina e cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-19)} = 21.444$; $p < 0.001$; Fig. 9). Na amígdala, os níveis de TBARS também aumentaram no grupo veículo tratado com cetamina e no grupo rapamicina tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina, no entanto, foi diminuído no grupo rapamicina tratado com salina quando comparado com o grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-17)} = 7.111$; $p = 0.004$; Fig. 9). Já no NAC, os níveis de TBARS estiveram diminuídos nos grupos rapamicina tratados com salina e cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-19)} = 6.459$; $p < 0.05$; Fig. 9).

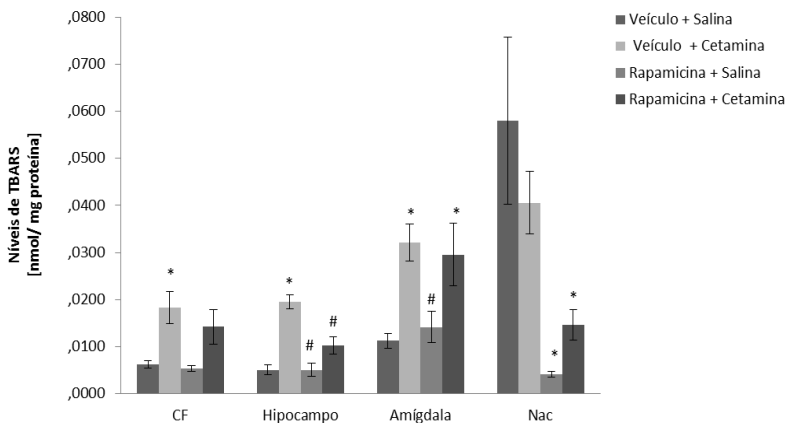


Figura 9 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis de TBARS no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 10 mostra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF sobre a formação de proteínas carbonil no CF, amígdala, hipocampo e NAc. No CF houve um aumento na formação de proteínas carbonil no grupo veículo tratado com cetamina quando comparado com o grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-19)} = 7.655$; $p = 0.002$; Fig. 10). Na amígdala, a formação de proteínas carbonil aumentou no grupo veículo tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina e diminuiu no grupo rapamicina tratado com salina em comparação com o grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-17)} = 6.429$; $p = 0.006$; Fig. 10). No NAc, houve um aumento na formação de proteínas carbonil no grupo veículo tratado com cetamina quando comparado com o grupo veículo tratado com salina e uma diminuição nos grupos rapamicina tratados com salina e cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-19)} = 17.449$; $p < 0.001$; Fig. 10), demonstrando que a rapamicina foi capaz de abolir os efeitos da cetamina sobre a formação de proteínas carbonil nesta região cerebral. No hipocampo, não foi observado diferença estatística em nenhum dos grupos na formação de proteínas carbonil ($F_{(3-19)} = 0,773$; $p = 0.526$; Fig. 10).

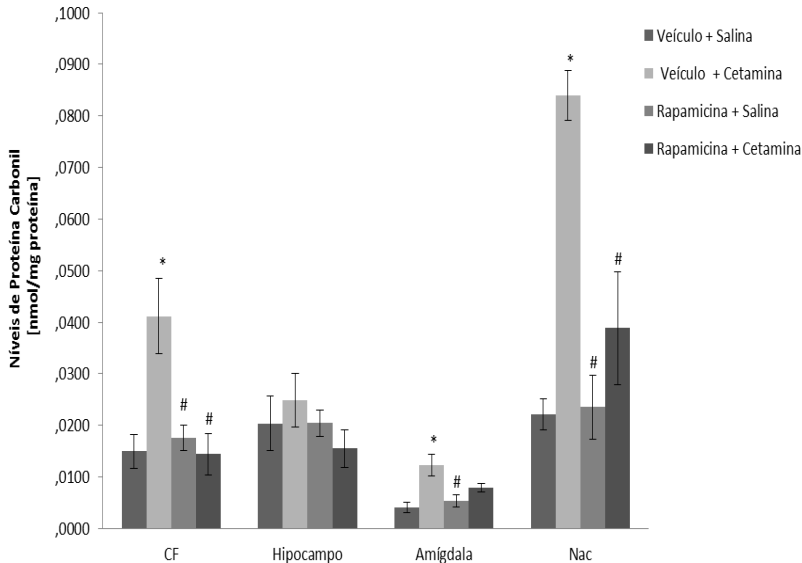


Figura 10 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre formação de proteínas carbonil no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 11 demonstra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo e núcleo acumbens. No CF ($F_{(3-19)} = 6.541$; $p = 0.004$; Fig. 11) e na amígdala ($F_{(3-17)} = 6.270$; $p = 0.006$; Fig. 11) houve um aumento na concentração de nitrito/nitrato no grupo veículo tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina e uma diminuição no grupo rapamicina tratado salina em comparação com o grupo veículo tratado com salina. No hipocampo, a concentração de nitrito/nitrato aumentou no grupo veículo tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina e diminuiu nos grupos rapamicina tratados com salina e cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-19)} = 10.616$; $p < 0.001$; Fig. 11), demonstrando que rapamicina foi capaz de bloquear os efeitos da cetamina na concentração de nitrito/nitrato nesta região cerebral. No NAc, houve um aumento da concentração de nitrito/nitrato no grupo veículo tratado cetamina e uma

diminuição no grupo rapamicina tratado com salina em comparação com o grupo veículo tratado com salina, e ainda, uma diminuição nos grupos rapamicina tratados com salina e cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com cetamina. ($F_{(3-18)} = 16.691$; $p < 0.001$; Fig. 11), mostrando novamente que a rapamicina foi capaz de bloquear os efeitos da cetamina sobre a concentração de nitrito/nitrato.

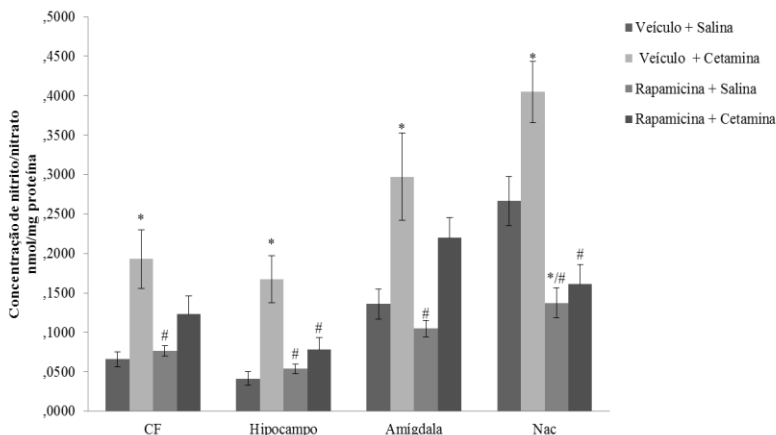


Figura 11 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre concentração de nitrito/nitrato no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 12 ilustra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF sobre a atividade da mieloperoxidase no CF, amígdala, hipocampo e NAc. No hipocampo, a atividade da mieloperoxidase aumentou no grupo veículo tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina; e diminuiu no grupo rapamicina tratado salina em comparação com o grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-17)} = 4.366$; $p < 0.023$; Fig. 12). No NAc, a atividade da mieloperoxidase também aumentou no grupo veículo tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina e diminuiu nos grupos rapamicina tratados com salina e cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-17)} = 7.377$; $p = 0.003$; Fig. 12). Não foi observada diferença significativa em nenhum dos grupos na atividade da mieloperoxidase no CF ($F_{(3-18)} =$

0.672; $p = 0.582$; Fig. 12) e amígdala ($F_{(3-15)} = 2.071$; $p = 0.158$; Fig. 12).

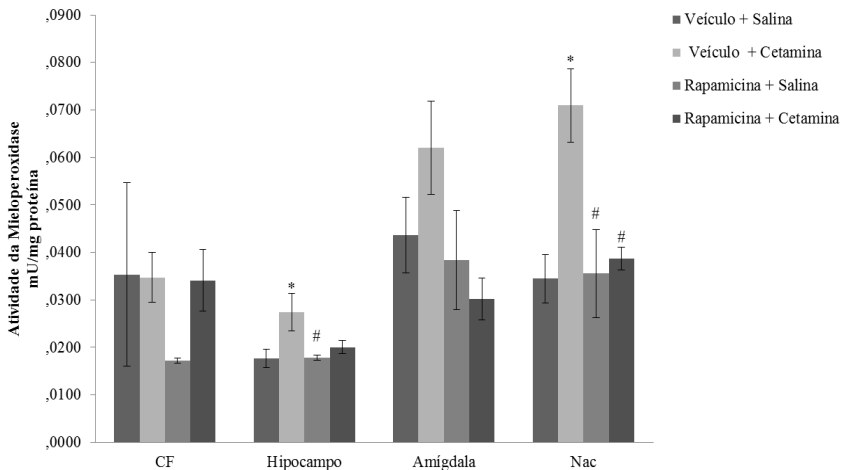


Figura 12 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre atividade da mieloperoxidase no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

4.3 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NA ATIVIDADE DA SOD E CAT EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

A Figura 13 mostra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF sobre a atividade da SOD no CF, amígdala, hipocampo e NAc. No CF, a atividade da SOD diminuiu no grupo veículo tratado com cetamina em relação ao grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-19)} = 5.224$; $p = 0.010$; Fig. 13). No hipocampo, a atividade da SOD diminuiu nos grupos veículo e rapamicina tratados com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina, e aumentou no grupo rapamicina tratado com salina em relação ao grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-19)} = 13.955$; $p < 0.001$; Fig. 13). Na amígdala, a atividade da SOD diminuiu nos grupos veículo e rapamicina tratados com cetamina e aumentou no grupo rapamicina tratado com salina em relação ao grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-18)} = 9.351$; $p = 0.001$; Fig. 13). Já no NAc, houve uma diminuição da atividade da

SOD nos grupos veículo e rapamicina tratados com cetamina quando comparado com o grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-19)} = 12.687$; $p < 0.001$; Fig. 13).

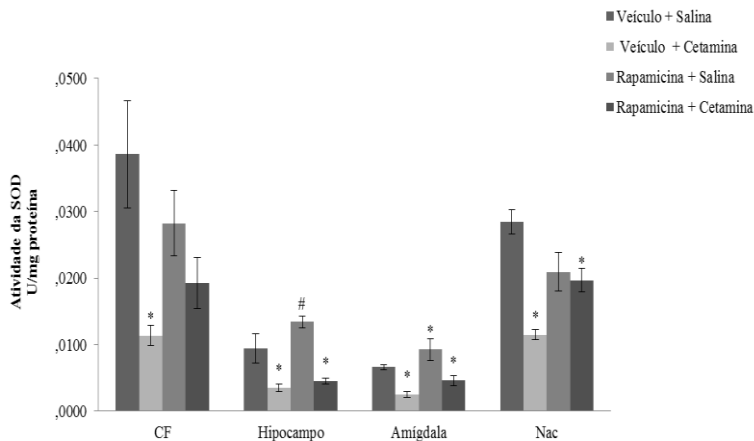


Figura 13 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre atividade da SOD no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 14 aponta os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF sobre a atividade da CAT no córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo e núcleo acumbens. No CF e no NAc houve uma diminuição da atividade da CAT no grupo veículo tratado com cetamina em relação ao grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-19)} = 3.093$; $p < 0.05$; Fig. 14). No hipocampo ($F_{(3-19)} = 11.464$; $p < 0.001$; Fig. 14) e no NAc ($F_{(3-19)} = 17.256$; $p < 0.001$; Fig. 14), a atividade da CAT diminuiu nos grupos veículo e rapamicina tratados com cetamina em relação com o grupo veículo tratado com salina, e ainda, aumentou no grupo rapamicina tratado com salina em comparação ao grupo veículo tratado com cetamina. Na amígdala, a atividade da CAT diminuiu no grupo veículo tratado com cetamina e nos grupos rapamicina tratados com salina e cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-18)} = 14.298$; $p < 0.001$; Fig. 14).



Figura 14 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre a atividade da CAT no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

4.4 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NOS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS NO SORO

A Figura 15 apresenta os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro. No soro, os níveis de TNF- α foram aumentados nos grupos veículo e rapamicina tratados com cetamina quando comparado com o grupo veículo tratado com salina ($F_{(3-21)} = 16.016$; $p < 0.001$; Fig. 15). No entanto, não foi observada diferença estatística em nenhum dos grupos nos níveis de IL-1 β ($F_{(3-21)} = 0.606$; $p = 0.619$; Fig. 15) e IL-6 ($F_{(3-19)} = 1.818$; $p = 0.184$; Fig. 15) no soro.

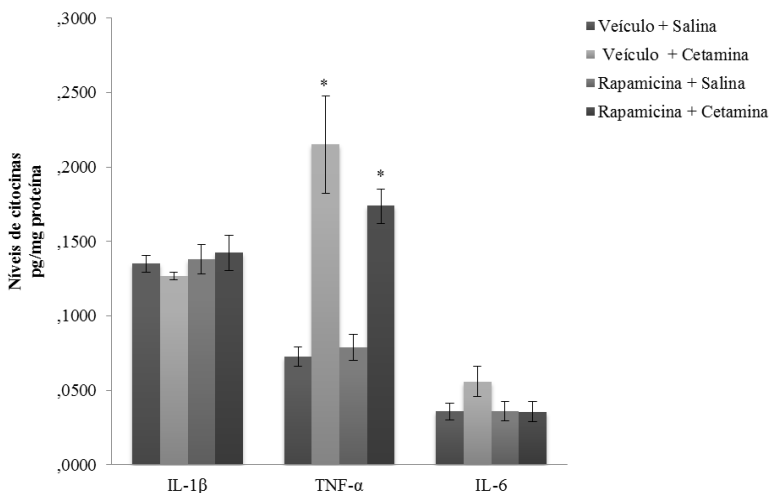


Figura 15 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro. As barras representam média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ vs. veículo + salina, de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

4.5 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NOS NÍVEIS DA PROTEÍNAS MTOR, 4EBP1 E EFF2K EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

A Figura 16 demonstra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF nos níveis da proteína mTOR no CF, amígdala, hipocampo e NAc. No CF houve uma diminuição dos níveis da proteína mTOR nos grupos rapamicina tratados com salina e cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina e no grupo rapamicina tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-12)} = 11,335$; $p = 0,003$; Fig. 16), mostrando que rapamicina foi capaz de bloquear os níveis da proteína mTOR e abolir os efeitos da cetamina nesta região cerebral. Não foi observada diferença significativa para nenhum dos grupos no hipocampo ($F_{(3-12)} = 1,213$; $p = 0,365$; Fig. 16), amígdala ($F_{(3-15)} = 2,204$; $p = 0,140$; Fig. 16) e NAc ($F_{(3-12)} = 0,494$; $p = 0,694$; Fig. 16).

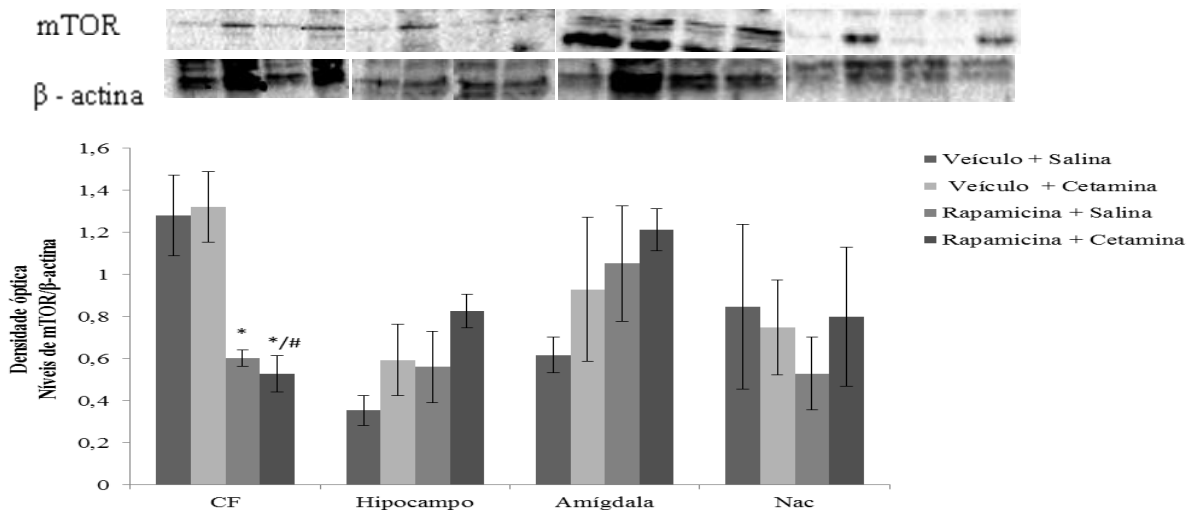


Figura 16 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína mTOR no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. *P < 0,05 vs. veículo + salina; #p < 0,05 vs. veículo + cetamina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 17 ilustra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF nos níveis da proteína p4EBP1 no córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo e núcleo acumbens. No CF houve uma diminuição da proteína p4EBP1 no grupo rapamicina tratado com cetamina em relação ao grupo veículo tratado com salina, ao grupo veículo tratado com cetamina e ao grupo rapamicina tratado com salina ($F_{(3-15)} = 4.596$; $p = 0.013$; Fig. 17). No NAc, os níveis da proteína p4EBP1 diminuíram no grupo rapamicina tratado com cetamina em relação ao grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-15)} = 2.264$; $p < 0.05$; Fig. 17). Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos grupos nos níveis da proteína p4EBP1 no hipocampo ($F_{(3-15)} = 1.617$; $p = 0.237$; Fig. 17) e na amígdala ($F_{(3-15)} = 1.091$; $p = 0.390$; Fig. 17).

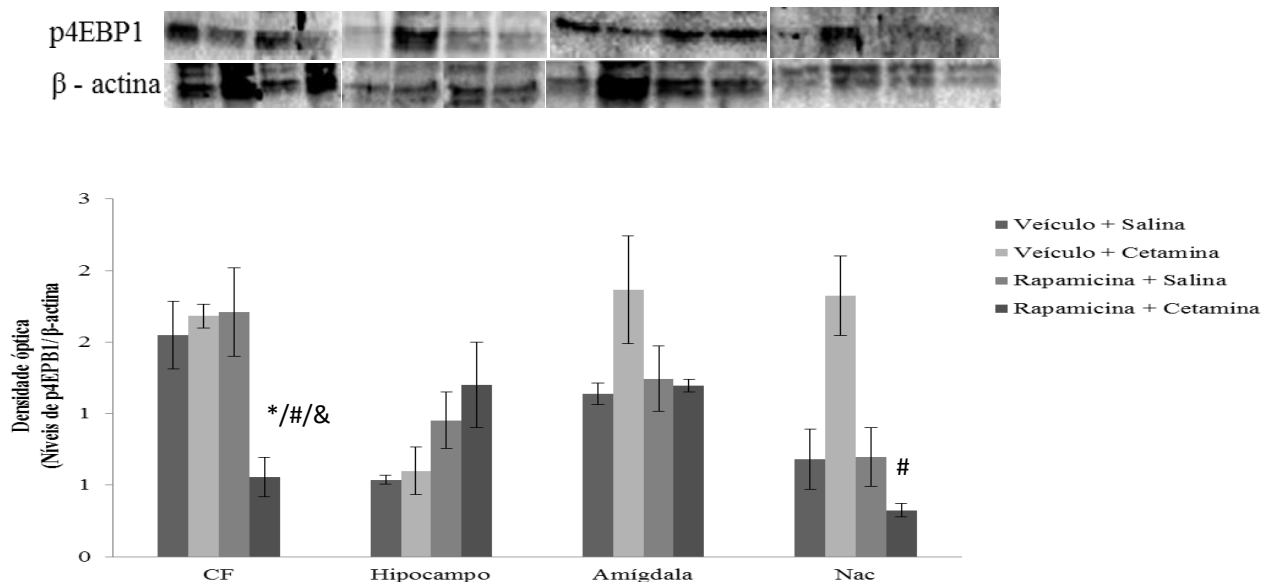


Figura 17 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína p4EBP1 no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina; & $p < 0,05$ vs. rapamicina + salina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 18 aponta os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF nos níveis da proteína pEF2K no CF, amígdala, hipocampo e NAc. No CF os níveis da pEF2K aumentaram nos grupo veículo tratado com cetamina em comparação com o grupo veículo tratado com salina e diminuíram no grupo rapamicina tratado com cetamina quando comparado com o grupo veículo tratado com cetamina ($F_{(3-14)} = 7.260$; $p = 0.006$; Fig. 18). Não houve diferença estatística em nenhum dos grupos nos níveis da proteína pEF2K no hipocampo ($F_{(3-15)} = 1.038$; $p = 0.411$; Fig. 18), amígdala ($F_{(3-15)} = 2.554$; $p = 0.104$; Fig. 18) e núcleo acumbens ($F_{(3-14)} = 0.253$; $p = 0.857$; Fig. 18).

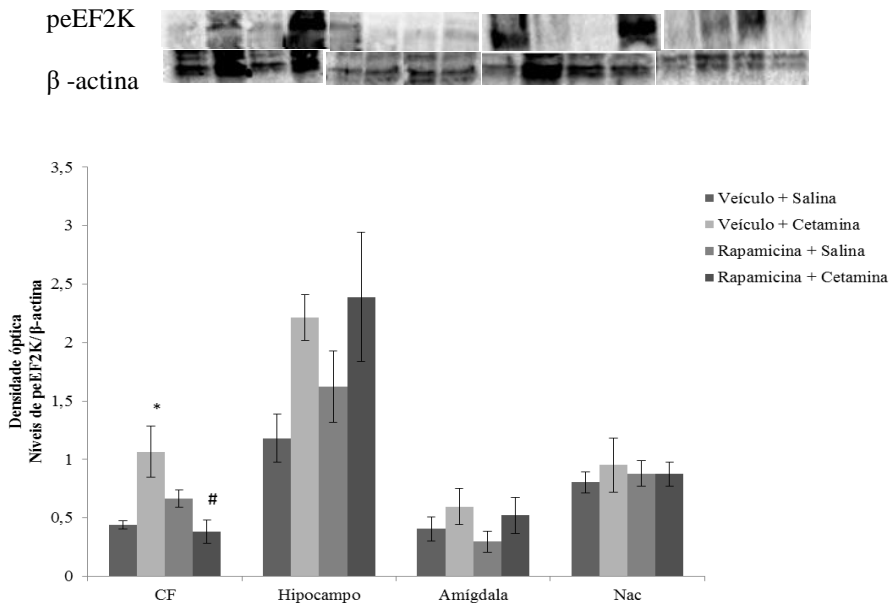


Figura 18 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína peEF2K no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs. veículo + salina; # $p < 0,05$ vs. veículo + cetamina; de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

4.6 EFEITOS DA CETAMINA APÓS A INIBIÇÃO DA VIA MTOR COM RAPAMICINA NO CF NOS NÍVEIS DA PROTEÍNAS CHOP, IRE1-ALFA E PERK EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

A Figura 19 ilustra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF nos níveis da proteína CHOP no CF, amígdala, hipocampo e NAc. Não foi observada diferença estatística em nenhum dos grupos nos níveis da proteína CHOP no CF ($F_{(3-15)} = 1.186$; $p = 0.356$; Fig. 19), amígdala ($F_{(3-15)} = 0.538$; $p = 0.664$; Fig. 19), hipocampo ($F_{(3-15)} = 1.997$; $p = 0.168$; Fig. 19) e NAc ($F_{(3-15)} = 0.584$; $p = 0.636$; Fig. 19).

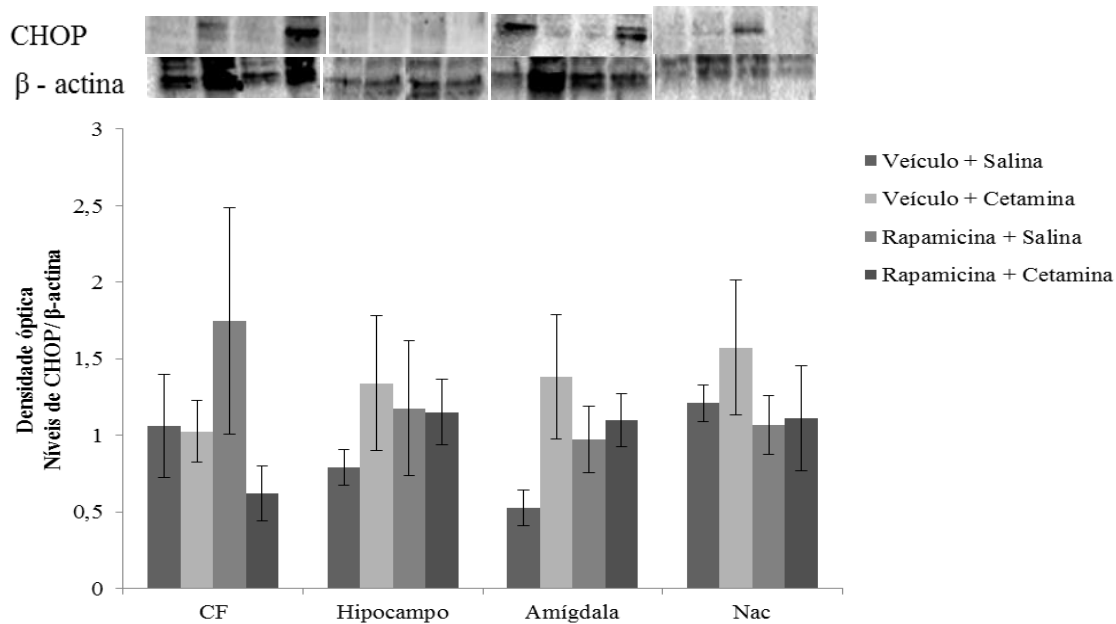


Figura 19 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína CHOP no CF, hipocampo, amígdala e Nac. As barras representam média \pm desvio padrão.

A Figura 20 apresenta os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF nos níveis da proteína IRE1-alfa no CF, amígdala, hipocampo e NAc. No CF, os níveis da proteína IRE1-alfa diminuíram no grupo rapamicina tratado com cetamina em comparação com o grupo rapamicina tratado com salina ($F_{(3-15)} = 2.470$; $p < 0.05$; Fig. 20). Não foi observada diferença estatística em nenhum dos grupos nos níveis da proteína IRE1-alfa na amígdala ($F_{(3-15)} = 0.857$; $p = 0.145$ Fig. 20), hipocampo ($F_{(3-15)} = 0.857$; $p = 0.494$; Fig. 20) e NAc ($F_{(3-15)} = 1.189$; $p = 0.355$ Fig. 20).

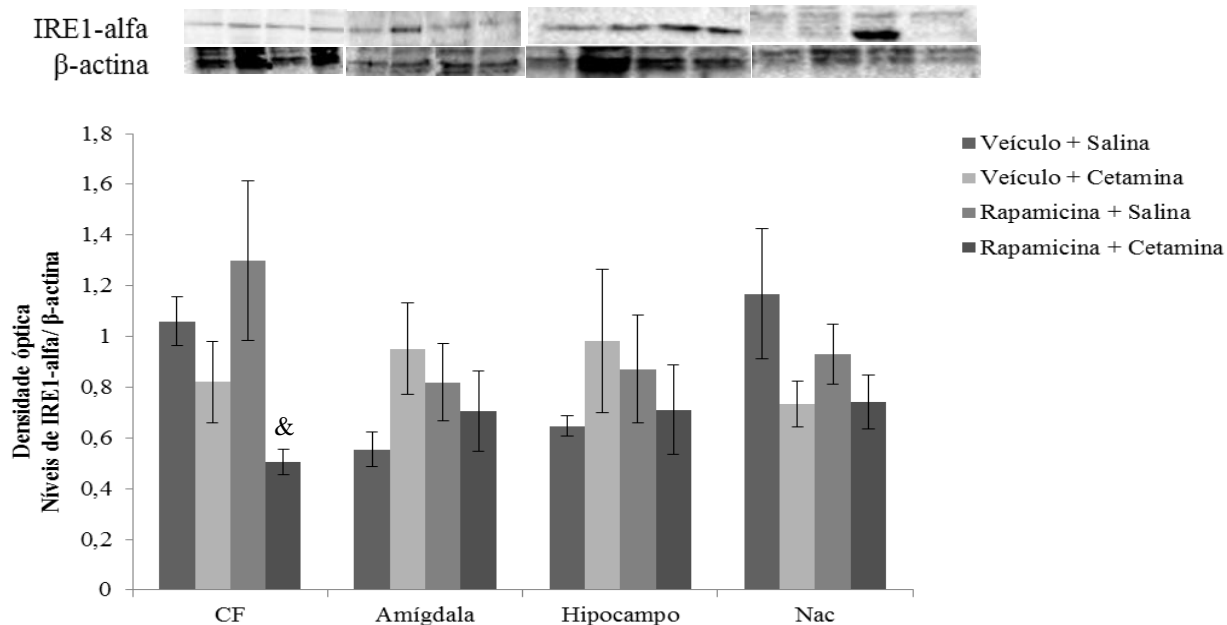


Figura 20 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína IRE1-alfa no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. &p<0.05 vs. rapamicina + salina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

A Figura 21 demonstra os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR com rapamicina no CF nos níveis da proteína PERK no CF, amígdala, hipocampo e NAc. No CF, os níveis da proteína PERK diminuíram no grupo rapamicina tratado com cetamina em comparação com o grupo rapamicina tratado com salina ($F_{(3-15)} = 3.803$; $p = 0.046$; Fig. 21). Não foi observada diferença estatística em nenhum dos grupos nos níveis da proteína PERK na amígdala ($F_{(3-15)} = 3.363$; $p = 0.063$; Fig. 21), hipocampo ($F_{(3-15)} = 2.449$; $p = 0.114$; Fig. 21) e NAc ($F_{(3-15)} = 2.900$; $p = 0.087$; Fig. 21).

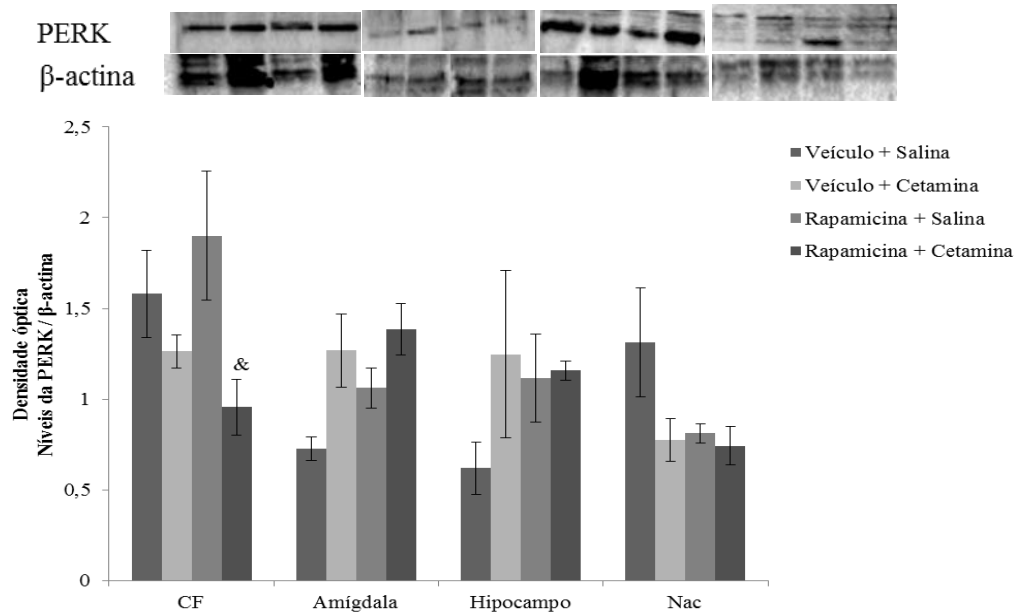


Figura 21 - Efeitos da administração de cetamina após a infusão do inibidor rapamicina no CF sobre os níveis da proteína PERK no CF, hipocampo, amígdala e NAc. As barras representam média \pm desvio padrão. & $p < 0.05$ vs. rapamicina + salina de acordo com a ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

5 DISCUSSÃO

A mTOR é uma proteína quinase envolvida na proliferação, mortalidade, sobrevivência celular e síntese proteica (Hay e Sonenberg, 2004). As alterações na sua via de sinalização têm sido sugeridas como sendo uma característica fisiopatológica dos transtornos neuropsiquiátricos (Hoeffler e Klann, 2010). De fato, um estudo *pós-mortem* mostrou déficits da proteína mTOR no CF de indivíduos diagnosticados com TDM (Jernigan et al., 2011). Além da diminuição da sua expressão proteica, foi demonstrado uma redução da síntese dos seus principais efetores de sinalização, tais como S6 quinase, eEF2K e 4EPB1 (Jernigan et al., 2011), sugerindo que déficits nas proteínas dependentes da mTOR podem também contribuir para a fisiopatologia do TDM.

A ativação de receptores pós-sinápticos de glutamato inicia uma cascata que resulta na fosforilação da mTOR e, eventualmente, leva a síntese de proteínas dos efetores abaixo da mTOR (Jernigan et al., 2011). A desregulação do sistema glutamatérgico pode levar a alteração na síntese proteica (Goswami et al., 2013). De fato, uma dose baixa de cetamina, que já demonstrou ações antidepressivas em modelos animais de depressão (Maeng et al., 2008; Réus et al. 2015a,b, 2016), ativou rapidamente a via de sinalização mTOR no CF de ratos (Li et al., 2010). Além disso, a cetamina produziu um aumento rápido e transitório semelhante nas formas fosforiladas e ativadas da quinase regulada por sinal extracelular (ERK, incluindo ERK1 e ERK2), proteína quinase B (PKB/AKT) e vias de sinalização de fatores de crescimento que estão associadas à ativação da via de sinalização mTOR (Hoeffler e Klann, 2010). Porém, a ativação das proteínas 4EBP1, p70S6K, ERK, mTOR e AKT pela cetamina, foi dependente da dose, ocorrendo em doses relativamente baixas que produzem efeitos semelhantes aos antidepressivos (Maeng et al., 2008). Além disso, a rapamicina, um inibidor específico da via de sinalização mTORC1, bloqueou completamente a sinaptogênese e os efeitos antidepressivos induzidos pela cetamina no CF de ratos (Li et al., 2010).

A rapamicina é um potente e específico inibidor da mTOR (Zhou et al., 2010). Este inibidor liga-se à proteína citosólica de ligação FK12 (FKBP12) (Erlich et al., 2007). Deste modo, o complexo rapamicina-FKBP12 pode inibir a mTOR impedindo a fosforilação adicional de p70S6K, 4EPB1 e, indiretamente, outras proteínas envolvidas na transcrição, tradução e no controle do ciclo celular (Vignot et al., 2005). A inibição da mTOR conduz, entre outros fatores, o bloqueio do ciclo

celular em células tumorais, resultando em um atraso do crescimento (Vignot et al., 2005). Ainda, sinais anti-apoptóticos mediados pela mTOR também foram antagonizados pela rapamicina (Guba et al., 2002). Koehl e colaboradores (2004) demonstraram que a rapamicina inibiu o crescimento de células de melanoma e apresentou um efeito imunossupressor prevenindo a rejeição de órgãos transplantados em um modelo animal. Além da sua capacidade imunossupressora, a rapamicina também preveniu a reestenose da artéria coronária (Sousa et al., 2003) e atuou como um composto neuroprotetor em várias doenças neurológicas (Erlich et al., 2007; Pan et al., 2009; Malagelada et al., 2010; Bove et al., 2011).

No presente estudo, foi demonstrado que a cetamina, na dose de 15 mg/kg, diminuiu o tempo de imobilidade em animais submetidos ao TNF. Todavia, a administração do inibidor rapamicina foi capaz de bloquear os efeitos antidepressivos da cetamina. De acordo com o presente estudo, Li e colaboradores (2010) também relataram que uma infusão local de rapamicina no CF bloqueou os efeitos comportamentais da cetamina no TNF e o comportamento anedônico, sugerindo que a ativação da mTOR no CF foi essencial para os efeitos antidepressivos do fármaco em estudo.

O estresse oxidativo é uma condição na qual ocorre desequilíbrio entre a produção de radicais livres e defesas antioxidantes (Nordberg e Arner, 2001). No presente estudo, mostrou-se que a administração aguda de cetamina levou a um aumento dos parâmetros de estresse oxidativo, tais como os níveis de TBARS, carbonilação de proteínas, concentração de nitrito/nitrato e a atividade da MPO em algumas estruturas cerebrais e, quando administrado o inibidor rapamicina no CF, esses efeitos foram diminuídos ou até abolidos. Chiu e colaboradores (2014) relataram que uma única injeção de cetamina na dose de 50 mg/kg aumentou a peroxidação lipídica. Além disso, Vasconcelos e colaboradores (2015) mostraram que a administração crônica de cetamina causou déficits na memória de trabalho e gerou dano oxidativo no CF de ratos. Um estudo prévio demonstrou que a administração de cetamina na dose de 25 mg/kg aumentou os níveis de TBARS e a carbonilação de proteínas no CF, hipocampo, amígdala e estriado de ratos; porém a administração de estabilizadores de humor, tais como lítio e valproato, foram capazes de reverter o dano oxidativo induzido pela cetamina (Ghedim et al., 2012). Além disso, da Silva e colaboradores (2010) observaram que doses subanestésicas de cetamina induziram um efeito do tipo antidepressivo em ratos submetidos ao TNF

e de suspensão da cauda; porém, produziu dano oxidativo através do aumento da peroxidação lipídica, teor de nitrito e atividade da CAT e da diminuição da glutatona. Curiosamente, um efeito positivo da rapamicina sobre o dano oxidativo também foi demonstrado em outro estudo. Rotte e colaboradores (2012) demonstraram que em células dendríticas, a administração de lipopolissacarídeos (LPS) estimula a permuta de Na^+/H^+ , aumenta a produção de ERO e liberação de $\text{TNF-}\alpha$, porém todos esses efeitos foram atenuados na presença da rapamicina.

O presente trabalho foi o primeiro a avaliar os efeitos da inibição da via mTOR pela rapamicina no CF nos parâmetros de estresse oxidativo e a relação da inibição desta via no CF com outras estruturas cerebrais relacionadas com o TDM. A persistência do estresse oxidativo nas células tem sido reportada por ativar as vias de crescimento, tais como fosfatidil-inositol 3 cinase (PI3K)/AKT, que por sua vez, é conhecida por ativar a via mTOR (Slomovitz e Coleman, 2012; Zhang e Yang, 2013). Uma vez que, dependendo do contexto, as ERO podem ativar ou inibir a mTORC1, o estresse oxidativo crônico que ocorre nas células pode tanto estimular o crescimento quanto resultar em um dano oxidativo e inibir a mTORC1 (Hambright et al., 2015). Além disso, os agentes farmacológicos que inibem a mTOR, como a rapamicina, podem ativar a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) que leva a uma proteção dos neurônios contra distúrbios neurodegenerativos (Culmsee et al., 2001; Tain et al., 2009).

No presente trabalho também foi observado que a administração de cetamina foi capaz de diminuir a atividade da SOD e da CAT no córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e núcleo acumbens e a administração do inibidor da via mTOR não foi capaz de bloquear os efeitos da cetamina. Gazal e colaboradores (2014) também demonstraram que o tratamento com cetamina reduziu a atividade das enzimas SOD e CAT no hipocampo, porém, o tratamento com *Cecropia pachystachya*, uma planta com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, e com de lítio foi capaz de inibir os efeitos pró-oxidantes da cetamina. Hou e colaboradores (2013) também relataram que a administração crônica de cetamina, em um modelo animal de esquizofrenia, aumentou os níveis de óxido nítrico (ON) no CF, hipocampo e no soro e diminuiu a atividade da SOD no hipocampo e soro. Porém, os efeitos da cetamina parecem ser diferentes dependendo do tempo e dose administrada, por exemplo, Réus e colaboradores (2015a) revelaram que a atividade da SOD aumentou nos animais controles que receberam cetamina por 14 dias no córtex pré-frontal e no núcleo acumbens e diminuiu nos animais privados matematicamente no

córtex pré-frontal e hipocampo. Além disso, outro estudo demonstrou que em ratos privados matematicamente houve uma diminuição da atividade da SOD e da CAT, porém quando tratados agudamente com cetamina-S, esta foi capaz de reverter esta diminuição (Réus et al., 2015b).

A rapamicina quando administrada isoladamente, também foi capaz de aumentar a atividade da CAT e da SOD em algumas estruturas cerebrais (Hou et al., 2013). Calap-Quintana e colaboradores (2015) também observaram que a rapamicina foi capaz de proteger contra danos oxidativos e aumentar a transcrição de genes antioxidantes em um modelo animal usando *Drosophila*, modelo genético para diferentes doenças humanas incluindo as doenças neurodegenerativas Parkinson, Huntington, Ataxia espinocerebelar e Alzheimer. Dessa forma, alguns estudos sugerem que a rapamicina pode atuar como um composto neuroprotetor em várias doenças neurológicas (Malagelada et al., 2010; Bove et al., 2011). Porém, no presente estudo, a administração de rapamicina antes do tratamento com cetamina, não foi capaz de bloquear a diminuição da atividade dessas enzimas, sugerindo que a rapamicina pode apresentar efeito neuroprotetor quando administrada isoladamente. Além disso, esses efeitos antioxidantes foram apenas em algumas áreas cerebrais, tais como hipocampo, amígdala e núcleo acumbens como mostrado por Hou e colaboradores (2013), sugerindo também que quando a inibição da via mTOR ocorre no córtex pré-frontal, seu efeito neuroprotetor seja bloqueado apenas nesta estrutura cerebral.

Evidências suportam uma relação mútua entre a inflamação e o TDM (Schmidt et al., 2016). Estudos também já mostraram que a cetamina apresenta efeitos sobre o sistema imunológico (De Kock et al., 2013; Schmidt et al., 2016). O presente estudo mostrou que houve um aumento nos níveis de TNF- α no soro de ratos tratados com veículo e rapamicina e tratados com cetamina. Contrariando o presente trabalho, outros estudos mostraram que a cetamina foi capaz de evitar uma reação inflamatória exacerbada tanto em modelos animais quanto no soro de humanos (Kawasaki et al., 2001; Taniguchi et al., 2003; Lankveld et al., 2005). A sinalização da via mTOR desempenha um papel fundamental na modulação de respostas inatas e adaptativas (Thomson et al., 2009). De fato, uma grande parte da resposta imunitária que leva a expansão clonal de células T específicas de antígeno dependem da ativação da mTOR (Thomson et al., 2009). Dessa forma, a inibição farmacológica desta via pela rapamicina, pode ser potencialmente imunossupressora. Contrariamente aos achados do presente estudo, o tratamento com rapamicina *in vivo* foi capaz de reduzir a produção de IL-4 em pacientes

com lúpus eritematoso sistêmico (Lai et al., 2013). Outro estudo também mostrou que a rapamicina foi capaz de bloquear a ativação das células T em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, mostrando uma potencial resposta terapêutica (Sieling et al., 2000). O presente estudo é o primeiro a mostrar os efeitos do tratamento com cetamina após a inibição da via mTOR no CF sobre os níveis de citocinas. A discrepância nesses resultados comparados aos da literatura pode estar relacionada, pelo menos em parte, com o local de infusão da rapamicina.

A presente pesquisa também demonstrou que a rapamicina foi capaz de bloquear a proteína mTOR no CF e ainda, inibir os efeitos antidepressivos da cetamina, sem afetar as outras estruturas cerebrais analisadas. Estudos usando modelos animais de depressão sugerem um papel fundamental do CF na fisiopatologia do TDM e na resposta a antidepressivos (Chang et al., 2015). De fato, alguns estudos demonstram que o TDM está envolvido com alterações comportamentais no CF e sua conectividade com outros sistemas cerebrais (Godsil et al., 2013; Chang et al., 2015). Além disso, Genzel e colaboradores (2015) e Yu e colaboradores (2013) relataram que pacientes com TDM apresentam uma alteração na conectividade funcional das vias CF – hipocampo e CF-amígdala. Estudos sugerem que a cetamina e outros antidepressivos de ação rápida, mediados por receptores de glutamato e/ou fatores neurotróficos, estimulam o aumento da proteína mTOR no CF (Li et al., 2010; Palucha-Poniewiera et al., 2014), levando a uma ativação das proteínas 4EBP1 e S6 quinase, que regulam a expressão de genes e síntese de proteínas (Tang et al., 2015). Corroborando o presente estudo, Li e colaboradores (2010) também mostraram que a rapamicina, quando administrada no CF, foi capaz de bloquear a ativação da proteína mTOR e os efeitos antidepressivos induzidos pela cetamina.

A proteína mTOR regula a síntese proteica através da fosforilação e inativação de 4EBP1, repressor da tradução de RNAm (Hay e Sonenberg, 2004). Esta proteína cuja fosforilação é inibida pela rapamicina *in vivo*, pode ser fosforilada, *in vitro*, pela mTOR recombinante (Brunn et al., 1997, Burnett et al., 1998). De fato, o presente estudo mostrou que os níveis da proteína 4EBP1 foram diminuídos no CF e no NAc no grupo rapamicina tratado com cetamina, demonstrando que a rapamicina foi capaz de bloquear os efeitos do fármaco em estudo. Li e colaboradores (2010) demonstraram que a indução da fosforilação da proteína 4EBP1 pela cetamina também foi bloqueada pela infusão intracerebroventricular dos inibidores da ERK (U0126) ou da AKT (LY294002) no CF. No entanto, este é o primeiro

estudo a mostrar esses efeitos da proteína 4EBP1 no NAc após a inibição da via mTOR no CF. Alguns estudos já demonstraram que a exposição aguda e crônica à drogas de abuso está associada a um aumento na atividade da mTORC1 em regiões relacionadas a função de recompensa, especificamente no NAc (Neasta et al. 2010; Wu et al. 2011; James et al. 2014). De acordo com o papel da mTORC1 na tradução de proteínas sinápticas, o tratamento com rapamicina também reduziu significativamente a subunidade GluA1 do receptor AMPA e os níveis da proteína S6 quinase no NAc (James et al. 2016). Além disso, outros estudos mostraram que a infusão da rapamicina no NAc é efetiva para a diminuição do restabelecimento de estímulos excitatórios cerebrais (Wang et al., 2010) e aumento da sensibilização comportamental (Narita et al., 2005).

Um dos principais alvos ligado a proteína mTOR é a proteína S6 quinase, que promove o início da tradução de proteínas e regula o prolongamento da tradução através da ativação da eEF2K (Laplante e Sabatini, 2009; Hoeffler e Klann, 2010). A eEF2K é uma serina/treonina quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina, importante para a regulação do prolongamento da tradução de proteínas (Monteggia et al., 2013). O prolongamento é um processo que consome muita energia e a atividade da eEF2K é regulada por várias vias de sinalização (Liu e Proud, 2016). A eEF2K é expressa em neurônios e evidências recentes sugerem que ela pode estar envolvida em processos de aprendizagem, memória e no TDM (Liu e Proud, 2016). De fato, Park e colaboradores (2008) mostraram que a eEF2K desempenhou um papel importante na síntese da proteína associada a atividade regulatória do citoesqueleto (Arc/Arg3.1), uma proteína envolvida no tráfico do receptor dos neurotransmissores e na depressão de longo prazo, um processo que reflete mudanças na capacidade sináptica. O presente estudo mostrou que a infusão da rapamicina bloqueou os efeitos da cetamina no CF, e quando a cetamina foi administrada isoladamente, esta foi capaz de aumentar os níveis de eEF2K. Alguns estudos sugerem que a cetamina exerce seus efeitos sobre a expressão do BDNF através da inibição da sinalização do eEF2K, que normalmente regula negativamente a expressão do BDNF (Nosyreva e Kavalali, 2010; Autry et al., 2011). De fato, um estudo prévio mostrou que o tratamento com cetamina foi capaz de reverter a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo e NAc de animais submetidos ao modelo animal de privação materna (Réus et al., 2015a). No entanto, Heise e colaboradores (2014) demonstraram que a cetamina aumentou a expressão de BDNF e exerceu efeitos antidepressivos em ratos de linhagem sevalgem, mas não

em ratos nocautes para eEF2K. Este estudo é o primeiro a mostrar os efeitos da cetamina nos níveis de eEF2K após a inibição da via mTOR pela rapamicina no CF. No entanto, não foi demonstrada relevância estatística nas estruturas cerebrais tais como hipocampo, amígdala e NAc, somente no CF. Além disso, o presente estudo sugere que os efeitos da eEF2K sobre a fosforilação e o prolongamento da tradução de proteínas, podem ser também um importante mecanismo do rápido efeito antidepressivo da cetamina.

O RE, um importante local para a síntese de proteínas, dobramento e sinalização de cálcio, é altamente sensível a alterações na homeostase (Rao et al., 2004a). Com isso, o estresse do RE, uma condição que prejudica a função do RE, pode levar a um acúmulo de proteínas não enoveladas no lúmen (Rao et al., 2004b). Neste contexto, três proteínas residentes da membrana do RE são sequencialmente ativadas: PERK, IRE1-alfa e o ATF6, promovendo assim, a sobrevivência celular e prevenindo e/ou removendo as proteínas mal enoveladas (Chen et al., 2014). Os transdutores das UPR são ativados por fosforilação da PERK e IRE1-alfa ou por translocação do ATF6 para o complexo de Golgi quando o RE é estressado (Chen et al., 2014). A ativação destas proteínas promove uma cascata de sinalização intracelular que pode resultar na redução dos fatores de iniciação de tradução, assim como ativação de outras moléculas que servem como biomarcadores, tais como, eIF2 α e CHOP (Dara et al., 2005). O estresse excessivo e prolongado do RE pode desencadear em morte celular (McCullough et al., 2001) e está associado ao TDM (Gold et al., 2013). De fato, Nevell e colaboradores (2014) mostraram uma persistente ativação do estresse do RE em tecidos periféricos de pacientes com TDM. Além disso, alguns estudos já relataram uma relação entre o estresse de RE e a via de sinalização mTOR (Polak e Hall, 2009; Hotamisligil, 2010).

O presente trabalho mostrou que houve uma diminuição nos níveis de PERK e IRE1-alfa no CF no grupo rapamicina tratado com cetamina, sugerindo que a rapamicina foi capaz de bloquear os efeitos da cetamina nestes parâmetros. Chen e colaboradores (2014) relataram que a expressão proteica dos principais marcadores do estresse do RE, tais como PERK, pPERK e CHOP, foi induzida pela exposição a sertralina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS). No entanto, outro estudo mostrou que a fluvoxamina, um ISRS, não alterou os níveis da PERK (Omi et al., 2014). A interação entre o estresse de RE e mTORC1 é complexa, uma vez que a ativação das UPR pode ocorrer tanto *upstream* quanto *downstream* da mTORC1. A ativação persistente

da mTORC1 inicia a síntese de proteínas e a ativação das UPR, enquanto que na fase tardia induz o estresse do RE (Wang et al., 2016). Entretanto, o presente estudo mostrou que quando a rapamicina bloqueou os efeitos da cetamina, esta foi capaz de diminuir os níveis dos marcadores do estresse do RE, sugerindo que os efeitos antidepressivos da cetamina na via do estresse do RE podem também ser mediados pela via de sinalização mTOR.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos da cetamina após a inibição da via mTOR pela rapamicina no CF sobre os parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo, níveis de citocinas, níveis de proteínas relacionadas com a via mTOR e ER. Além disso, este estudo foi o primeiro a demonstrar a relação da inibição da via mTOR no CF com outras estruturas cerebrais relacionadas com o TDM.

O presente estudo mostrou que a rapamicina bloqueou os efeitos antidepressivos da cetamina no TNF e nos níveis de proteínas relacionadas a via mTOR e ER, contudo estes efeitos foram dependentes da área cerebral estudada. Também foi observado que a rapamicina foi capaz de abolir o dano oxidativo causado pela cetamina e melhorar os efeitos antioxidantes em algumas áreas cerebrais. Os resultados do presente trabalho sugerem que a inibição da via de sinalização mTOR pela rapamicina pode estar envolvida, pelo menos em parte, com o mecanismo de ação da cetamina e que apresenta um efeito neuroprotetor após a redução do estresse oxidativo induzido pela cetamina. Ainda, os resultados também sugerem que o efeito antidepressivo da cetamina sobre a via do ER pode também ser mediada pela via de sinalização mTOR.

Os resultados do presente estudo sugerem que a via de sinalização mTOR possa ser uma inovadora e valiosa estratégia para a descoberta de novos fármacos com ações antidepressivas rápidas. No entanto, estudos adicionais são necessários para melhor explicar como esses efeitos intrínsecos ocorrem.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121–126.
- Appenzeller-Herzog C, Hall MN. Bidirectional crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Trends Cell Biol.* 2012; 22:274-282.
- Arango V, Underwood MD, Gubbi AV, Man JJ. Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res.* 1995; 688:121–133.
- Auer DP, Pütz B, Kraft E, Lipinski B, Schill J, Holsboer F. Reduced glutamate in the anterior cingulate cortex in depression: an in vivo proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry.* 2000; 47:305–313.
- Autry AE, Adachi M, Nosyreva E, Na ES, Los MF, Cheng PF, et al. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature.* 2011; 475: 91–95.
- Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G. Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1. *PLoS ONE.* 2009; 4:49-54.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32:279–312.
- Behr GA, Moreira JC, Frey BN. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 609421.
- Bell-McGinty S, Butters MA, Meltzer CC, Greer PJ, Reynolds CF 3rd, Becker JT. Brain morphometric abnormalities in geriatric depression: Long-term neurobiological effects of illness duration. *Am J Psychiatry.* 2002; 159:1424–1427.
- Belmaker RH, Agam G. Major depressive disorder. *N Engl J Med.* 2008; 358: 55–68.

- Berman RM, Cappiello A, Anand A, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000; 47:351-354.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000; 2: 326-332.
- Beurel E, Song L, Jope RS. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice. *Mol Psychiatry*. 2011; 16: 1068–1070.
- Bilici M, Efe H, Köroğlu MA, Uydu HA, Bekaroğlu M, Değer O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord*. 2001; 64(1): 43-51.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ*. 2012; J5:9-19.
- Biver F, Wikler D, Lotstra F, Damhaut P, Goldman S, Mendlewicz J. Serotonin 5-HT₂ receptor imaging in major depression: Focal changes in orbito-insular cortex. *Br J Psychiatry*. 1997; 171:444–448.
- Björkholm C, Jardemark K, Schilström B, Svensson TH. Ketamine-like effects of a combination of olanzapine and fluoxetine on AMPA and NMDA receptor-mediated transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015; S0924: 00220-00225.
- Bove J, Martinez-Vicente M, Vila M. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12:437-452.
- Bowley MP, Drevets WC, Ongür D, Price JL. Low glial numbers in the amygdala in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2002;52(5):404-412.
- Bown C, Wang JF, MacQueen G, Young LT. Increased temporal cortex ER stress proteins in depressed subjects who died by suicide. *Neuropsychopharmacol*. 2000; 22:327-232.

- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. 2000; 157:115–118.
- Briley M, Moret C. Present and future anxiolytics. *IDrugs*. 2000; 3: 695–699.
- Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence Jr, JC, Abraham RT. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*. 1997; 277:99– 101.
- Burmeister M. Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Biol Psychiatry*. 1999; 45:522–532.
- Burnett PE1, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(4):1432-1437.
- Burt DB, Zembar MJ, Niederehe G. Depression and memory impairment: A meta-analysis of the association, its pattern, and specificity. *Psychol Bull*. 1995; 117:285–305.
- Calap-Quintana P1, Soriano S2, Llorens JV1, Al-Ramahi I3, Botas J3, Moltó MD4, Martínez-Sebastián MJ1. TORC1 Inhibition by Rapamycin Promotes Antioxidant Defences in a Drosophila Model of Friedreich's Ataxia. *PLoS One*. 2015; 10(7):e0132376.
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002; 415:92-96.
- Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A célula*. 2. ed São Paulo: Manole 2007; p 380.
- Chandran A, Iyo AH, Jernigan CS, Legutko B, Austin MC, Karolewicz B. Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 40:240-245.

- Chang CH, Chen MC, Lu J. Effect of antidepressant drugs on the vmPFC-limbic circuitry. *Neuropharmacology*. 2015; 92: 116-124.
- Chatuverdi HK, Bapna JS, Chandra D. Effect of fluvoxamine and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on shock-induced depression in mice. *Indian J Physiol Pharmacol* 2001; 45: 199–207.
- Chen X, Shen J, Prymes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol* 2002; 277: 13045-13052.
- Chen S, Xuan J, Couch L, Iyer A, Wu Y, Li QZ, Guo L. Sertraline induces endoplasmic reticulum stress in hepatic cells. *Toxicology*. 2014; 322:78-88.
- Chiu CT1, Scheuing L2, Liu G2, Liao HM2, Linares GR2, Lin D2, Chuang DM1. The mood stabilizer lithium potentiates the antidepressant-like effects and ameliorates oxidative stress induced by acute ketamine in a mouse model of stress. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;18(6). pii: pyu102.
- Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa FR, Stroud RM, Walter P. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 18773-18784.
- Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP. AMP activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci*. 2001; 17:45–58.
- da Silva FC, do Carmo de Oliveira Cito M, da Silva MI, Moura BA, de Aquino Neto MR, Feitosa ML, et al. Behavioral alterations and pro-oxidant effect of a single ketamine administration to mice. *Brain Res Bull*. 2010; 83:9–15.
- Dan HC, Cooper MJ, Cogswell PC, Duncan JA, Ting JP, Baldwin AS. Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev*. 2008; 22:1490–1500.

- Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology*. 2011; 53:1752–1763.
- De Kock M, Loix S, Lavand'homme P. Ketamine and peripheral inflammation. *CNS Neurosci Ther*. 2013; 19:403-410.
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989; 26: 335-341.
- Deldicque L, Bertrand L, Patton A, Francaux M, Baar K. ER stress induces anabolic resistance in muscle cells through PKB-induced blockade of mTORC1. *PLoS ONE*. 2011; 6:e20993.
- Di Nardo A, Kramvis I, Cho N, Sadowski A, Meikle L, Kwiatkowski DJ, Sahin M. Tuberous sclerosis complex activity is required to control neuronal stress responses in an mTOR-dependent manner. *J Neurosci*. 2009; 29:5926–5937.
- Dingledine RB, Bowie D, Traynelis, SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 1999; 51:7-61.
- Drevets WC. Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003; 985: 420–444.
- DSM-IV - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. Porto Alegre, Artes Medicas. 1994.
- Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*. 2003; 300:1574–1577.
- Duman RS. Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. *Biol Psychiatry*. 1998; 44:324-335.
- Dunn RT, Kimbrell TA, Ketter TA, Frye MA, Willis MW, Luckenbaug DA, Post RM. Principal components of the Beck Depression Inventory and regional cerebral metabolism in unipolar and bipolar depression. *Biological Psychiatry*. 2002;51:387–399.

- DuRose JB, Scheuner D, Kaufman RJ, Rothblum LI, Niwa M. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol.* 2009; 29:4295–4307.
- Erlich S, Alexandrovich A, Shohami E, Pinkas-Kramarski R. Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2007; 26:86e93.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186:407–421.
- Farber NB, Newcomer JW, Olney JW. The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders. Focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.* 1998; 116:421-437.
- Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol.* 2006; 16:1865-1870.
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008a; 32: 104-114.
- Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, Stertz L, Fries GR, Gavioli EC, Kapczinski F, Quevedo J. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008b; 103: 502-506.
- Garcia LSB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Stertz L, Kapczinski F, Gavioli EC, Quevedo J. Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2009; 30: 450-455.

García-Martínez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*. 2008; 416:375-385.

Gazal M, Valente MR, Acosta BA, Kaufmann FN, Braganhol E, Lencina CL, Stefanello FM, Ghisleni G, Kaster MP.

Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *Eur J Pharmacol*. 2014; 724:132-139.

Genzel L, Dresler M, Cornu M, et al. Medial prefrontal-hippocampal connectivity and motor memory consolidation in depression and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2015; 77: 177–186.

Ghasemi M, Kazemi MH², Yoosefi A³, Ghasemi A⁴, Paragomi P⁵, Amini H³, Afzali MH⁶. Rapid antidepressant effects of repeated doses of ketamine compared with electroconvulsive therapy in hospitalized patients with major depressive disorder. *Psychiatry Res*. 2014; 28;215:355-361.

Ghedim FV, FragaDde B, Deroza PF, Oliveira MB, Valvassori SS, Steckert AV, et al. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *J Psychiatr Res*. 2012; 46:1569–1575.

Godsil BP, Kiss JP, Spedding M, Jay TM. The hippocampal-prefrontal pathway: the weak link in psychiatric disorders? *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013; 23: 1165-1181.

Gold PW, Licinio J, Pavlatou MG. Pathological parainflammation and endoplasmic reticulum stress in depression: potential translational targets through the CNS insulin, klotho and PPAR-gamma systems. *Mol Psychiatry*. 2013; 18: 154–165.

Goswami DB¹, Jernigan CS, Chandran A, Iyo AH, May WL, Austin MC, Stockmeier CA, Karolewicz B. Gene expression analysis of novel genes in the prefrontal cortex of major

depressive disorder subjects. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 43:126-133.

Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, Taylor JR. Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol Psychiatry*. 2008; 63:353-359.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126:131-138.

Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*. 2002; 8:128-135.

Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med*. 2005; 11:353-361.

Hambright HG, Meng P, Kumar AP, Ghosh R. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis disrupts oxidative stress-mediated survival of melanoma cells. *Oncotarget*. 2015; 6:7195-7208.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999; 397: 271-274.

Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2007; 62:1310-1316.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2006; 18:1926-1945.

Heise C, Gardoni F, Culotta L, Di LM, Verpelli C, Sala C. Elongation factor-2 phosphorylation in dendrites and the regulation of dendritic mRNA translation in neurons. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8:35.

Hoeffler CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci*. 2010; 33:67-75.

- Hosoi T, Hyoda K, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K. Akt up- and down-regulation in response to endoplasmic reticulum stress. *Brain Res.* 2007; 1152:27–31.
- Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond).* 2008; 32:S52–S54.
- Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010; 140, 900–917.
- Hou Y, Zhang H, Xie G, Cao X, Zhao Y, Liu Y, Mao Z, Yang J, Wu C. Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013; 45:107–116.
- Hu P, Han Z, Couvillon AD, Exton JH. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Biol Chem.* 2004; 279:49420–49429.
- Hustveit OI, Maurset A, Oye I. Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, sigma and muscarinic receptors. *Pharmacol Toxicol.* 1995;77(6):355–359.
- Ishisaka M, Kakefuda K, Yamauchi M, Tsuruma K, Shimazawa M, Tsuruta A, Hara H. Luteolin shows an antidepressant-like effect via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34:1481–1486.
- Ishisaka M, Kakefuda K, Yamauchi M, Tsuruma K, Shimazawa M, Tsuruta A, Hara H. Luteolin shows an antidepressant-like effect via suppressing endoplasmic reticulum stress. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34:1481–1486.
- Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biol.* 2004; 6:1122–1128.
- James MH, Quinn RK, Ong LK, Levi EM, Charnley JL, Smith DW, Dickson PW, Dayas CV. mTORC1 inhibition in the

nucleus accumbens 'protects' against the expression of drugs seeking and 'relapse' and is associated with reductions in GluA1 AMPAR and CAMKII alpha levels. *Neuropsychopharmacol.* 2014; 39:1694–1702.

James MH, Quinn RK, Ong LK, Levi EM, Smith DW, Dickson PW, Dayas CV. Rapamycin reduces motivated responding for cocaine and alters GluA1 expression in the ventral but not dorsal striatum. *Eur J Pharmacol.* 2016; 784:147-154.

Jeon SH, Kim Y, Kim YS, Lim Y, Lee YH, Shin SY. The tricyclic antidepressant imipramine induces autophagic cell death in U87MG glioma cells. *Biochem Biophys Res.* 2011; 23:311-317.

Jernigan CS, Goswami DB, Austin MC, Iyo AH, Chandran A, Stockmeier CA, et al. The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35:1774–1779.

Joseph R. Neuroanatomy of psychosis: depression, mania hysteria, obsessive-compulsions, hallucinations, schizophrenia. In: *Neuropsychiatry, neuropsychology and clinical neuroscience*, 2 ed., p. 595-622. Baltimore: Library of Congress, 1996.

Jurczak MJ, Lee AH, Jornayvaz FR, Lee HY, Birkenfeld AL, Guigni BA, Kahn M, Samuel VT, Glimcher LH, Shulman GI. Dissociation of inositol requiring enzyme (IRE1 alpha)-mediated JNK activation from hepatic insulin resistance in conditional X-box binding protein-1 (XBP1) knockout mice. *J Biol Chem.* 2012; 287:2558–2567.

Karassek S, Berghaus C, Schwarten M, Goemans CG, Ohse N, Kock G, Jockers K, Neumann S, Gottfried S, Herrmann C, Heumann R, Stoll R. Ras homolog enriched in brain (Rheb) enhances apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2010; 285:33979–33991.

Kato H, Nakajima S, Saito Y, Takahashi S, Katoh R, Kitamura M. mTORC1 serves ER stress-triggered apoptosis via selective

activation of the IRE1–JNK pathway. *Cell Death Differ.* 2012; 19:310–320.

Kawasaki C, Kawasaki T, Ogata M, Nandate K, Shigematsu A. Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood. *Can J Anaesth.* 2001; 48:819–823.

Kennedy SH, Javanmard M, Vaccarino FJ. A review of functional neuroimaging in mood disorders: positron emission tomography and depression. *Can J Psychiatry.* 1997;42:467-75.

Kind PC, Neumann PE. Plasticity: downstream of glutamate. *Trends Neurosci.* 2001; 24:553-555. Review.

Koehl GE, Andrassy J, Guba M, Richter S, Kroemer A, Scherer MN, Steinbauer M, Graeb C, Schlitt HJ, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin protects allografts from rejection while simultaneously attacking tumors in immunosuppressed mice. *Transplantation.* 2004; 77:1319–1326.

Kohrs R, Durieux ME. Nonopioid Intravenous Anesthesia.

Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Clinical Anesthesia.* 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1998; 312-327.

Kohrs R1, Durieux ME. Ketamine: teaching an old drug new tricks. *Anesth Analg.* 1998;87(5):1186-1193.

Koike H, Chaki S. Requirement of AMPA receptor stimulation for the sustained antidepressant activity of ketamine and LY341495 during the forced swim test in rats. *Behav Brain Research.* 2014; 271:111-115.

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS.

Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry.* 1994; 51:199-214.

Kvamme E. Synthesis of glutamate and its regulation. *Prog Brain Res.* 1998; 116; 73-85.

- Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* (Bethesda). 2007; 22: 193-201.
- Lai ZW, Borsuk R, Shadakshari A, et al. mTOR activation triggers IL-4 production and necrotic death of double-negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2013; 191: 2236–2246.
- Lange C, Iirle E. Enlarged amygdala volume and reduced hippocampal volume in young women with major depression. *Psychological Medicine*. 2004; 34: 1059–1064.
- Lankveld DPK, Bull S, Van Dijk P, Fink-Gremmels J, Hellebrekers LJ. Ketamine inhibits LPS-induced TNF α and interleukin-6 in an equine macrophage cell line. *Vet Res*. 2005; 36:257–262.
- Lapidus KA, Soleimani L, Murrugh JW. Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2013;9:1101-1112.
- Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009; 122: 3589-3594.
- Larsen MH, Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Sandi C. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J Psychiatr Res*. 2010; 44; 808-816.
- Leal RB, Cordova FM, Lynn H, Bobrovskaya L, Dunkley PR. Lead-stimulate p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;178:44-51.
- Leal RB, Ribeiro SJ, Posser T, Cordova FM, Rigon AP, Zaniboni-Filho E, Bainy ACD. Modulation of ERK1/2 and p38MAPK by lead in the cerebellum of Brazilian catfish *Rhamdia quelen*. *Aquatic Toxicol*. 2006;77:98-104.
- Lee PH, Perlis RH, Jung JY, et al. Multi-locus genomewide association analysis supports the role of glutamatergic synaptic transmission in the etiology of major depressive disorder. *Transl Psychiatry*. 2012;2:184.

- Lee SY, Lee SJ, Han C, Patkar AA, Masand PS, Pae CU. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 46: 224-35.
- Lesch KP, Schmitt A. Antidepressants and gene expression profiling: how to SNARE novel drug targets. *Pharmacogenomics J*. 2002; 2:346-348.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186:464-478.
- Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*. 2010; 328:959-964.
- Li Y, Xu S, Giles A, Nakamura K, Lee JW, Hou X, Donmez G, Li J, Luo Z, Walsh K, Guarente L, Zang M. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *Faseb J*. 2011; 25:1664-1679.
- Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009;19:146-152.
- Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *N Engl J Med*. 1994; 330: 613-622.
- Liu R, Proud CG. Eukaryotic elongation factor 2 kinase as a drug target in cancer, and in cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2016; 37: 285-294.
- Liu RJ, Fuchikami M, Dwyer JM, Lepack AE, Duman RS, Aghajanian GK. GSK-3 inhibition potentiates the synaptogenic and antidepressant-like effects of subthreshold

doses of ketamine. *Neuropsychopharmacol.* 2013; 38:2268-2277.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1): 265-75.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Gavioli EC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress in submitochondrial particles into the brain of rats submitted to the chronic mild stress paradigm. *J Psychiatr Res.* 2009a; 43(9): 864-869.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Gavioli EC, Quevedo J. Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem Int.* 2009b; 54(5-6): 358-362.

Luft A, Mendes FF. Low S(+) ketamine doses: a review. *Revista Brasileira de Anestesiologia.* 2015; 55: 460-469.

Machado-Vieira R1, Zanetti MV2, Teixeira AL3, Uno M4, Valiengo LL5, Soeiro-de-Souza MG6, Oba-Shinjo SM7, de Sousa RT5, Zarate CA Jr7, Gattaz WF2, Marie SK4.

Decreased AKT1/mTOR pathway mRNA expression in short-term bipolar disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(4):468-473.

MacQueen GM, Campbell S, McEwen B, MacDonald K, Amano S, Joffe RT, et al. Course of illness, hippocampal function and volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:1387–1392.

Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry.* 2008;63:349-352.

Maeng S, Zarate CA. The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Curr Psychiatry Rep.* 2007; 9: 467-474.

Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Leunis JC. An IgM-mediated immune response directed against nitro-bovine serum albumin (nitro-BSA) in chronic fatigue syndrome (CFS) and major depression: evidence that nitrosative stress is another factor underpinning the comorbidity between major depression and CFS. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29 (3):313–9.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(3):676-92.

Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Greene LA. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010; 30:1166-1175.

Rozenhal M, Laks J, Engelhardt E. Aspectos neuropsicológicos da depressão. *R Psiquiatr RS.* 2004; 26: 204-212.

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. Chop induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes dev.* 2004; 18: 3066-3077.

Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev.* 2004;18:423–434.

Mayer ML, Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol.* 1987; 394:501-527.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by downregulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* 2001; 21, 1249–1259.

Meloni D, Gambarana C, De Montis MG, et al. Dizocilpine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned

helplessness in rats. *Pharmacol Biochem Be.* 1993; 46:423–426.

Micallef J, Tardieu S, Gentile S, Fakra E, Jouve E, Sambuc R, Blin O. Effects of a subanaesthetic dose of ketamine on emotional and behavioral state in healthy subjects.

Neurophysiol Clin. 2003; 33:138-147.

Mintun MA, Sheline YI, Moerlein SM, Snyder AZ. Regional [18F]altanserin binding in the treatment of major depression.

Neuroimage. 2000; 11:S83.

Monteggia LM, Gideons E, Kavalali ET. The role of eukaryotic elongation factor 2 kinase in rapid antidepressant action of ketamine. *Biol. Psychiatry.* 2013; 73:1199-1203.

Morilak DA, Frazer A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2004; 7: 193–218.

Murrough JW, Perez AM, Pillemer S, et al. Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. *Biol Psychiatry.* 2013; 74:250-256.

Nakajima S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Saito Y, Kato H, Huang T, Yao J, Paton AW, Paton JC, Kitamura M. Selective abrogation of BiP/GRP78 blunts activation of NF-kappaB through the ATF6 branch of the UPR: involvement of C/EBPbeta and mTOR-dependent dephosphorylation of Akt. *Mol Cell Biol.* 2011; 31: 1710–1718.

Narita M, Akai H, Kita T, Nagumo Y, Narita M, Sunagawa N, Hara C, Hasebe K, Nagase H, Suzuki T. Involvement of mitogen-stimulated p70-S6 kinase in the development of sensitization to the methamphetamine-induced rewarding effect in rats. *Neuroscience.* 2005; 132:553–560.

Neasta J, BenHamida S, Yowell Q, Carnicella S, Ron D. Role for mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in

- neuroadaptation underlying alcohol-related disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107, 20093–20098.
- Nemeroff CB, Owens MJ. Treatment of mood disorders. *Nature Neurosci*. 2002; 5: 1068-1070.
- Nestler EJ, Carlezon JR WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological Psychiatry*. 2006; 59: 1151–1159.
- Nevell L, Zhang K, Aiello AE, Koenen K, Galea S, Soliven R, et al. Elevated system icexpression of ER stress related genes is associated with stress-related mental disorders in the Detroit Neighborhood Health Study. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; 43: 62–70.
- Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacol Biochem Be*. 2012; 100:656-664.
- Nishitani N, Nagayasu K, Asaoka N, Yamashiro M, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Raphe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex. *International Journal of Neuropsychopharmacol*. 2014; 17: 1321-1326.
- Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31: 1287-1312.
- Nosyreva E, Kavalali ET. Activity-dependent augmentation of spontaneous neurotransmission during endoplasmic reticulum stress. *J Neurosci* 2010; 30:7358–7368.
- Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *Embo J*. 2005; 24:1243–1255.
- Omi T, Tanimukai H, Kanayama D, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Morihara T, Sato M, Yanagida K, Kitasyoji A, Hara H, Imaizumi K, Maurice T, Chevallier N, Marchal S, Takeda M, Kudo T. Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor. *Cell Death Dis*. 2014; 5: e1332.

Ongur D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:13290–13295.

Orrego F, Villanueva S. The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neurosci*. 1993; 56:539–555.

Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med*. 2012; 63: 317-328.

Ozcan U, Ozcan L, Yilmaz E, Düvel K, Sahin M, Manning BD, Hotamisligil GS. Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol Cell*. 2008; 29:541–551.

Palucha-Poniewiera A, Szewczyk B, Pilc A. Activation of the mTOR signaling pathway in the antidepressant-like activity of the mGlu5 antagonist MTEP and the mGlu7 agonist AMN082 in the FST in rats. *Neuropharmacology*. 2014; 82: 59–68.

Pan T, Rawal P, Wu Y, Xie W, Jankovic J, Le W. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction. *Neuroscience*. 2009; 164: 541-551.

Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 46: 214-23.

Park S, Park JM, Kim S, Kim JA, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, et al. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron*. 2008; 59: 70–83.

Paschen AW, Mengesdorf T. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium*. 2005; 38: 409-415.

Paul IA, Nowak G, Layer RT, Popik P, Skolnick P. Adaptation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex following

- chronic antidepressant treatments. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;269:95–102.
- Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*. 2011; 146:408–420.
- Pfenninger EG1, Durieux ME, Himmelseher S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers. *Anesthesiology*. 2002;96(2):357-66.
- Pilc A, Chaki S, Nowak G, Witkin JM. Mood disorders: Regulation by metabotropic glutamate Receptors. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75: 997 – 1006.
- Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33: 88–109.
- Polak P, Hal, MN. mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 2009; 21: 209–218.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther Archives*. 1977; 229: 327-336.
- Raeder JC, Stenseth LB. Ketamine: a new look at an old drug. *Current Opinion Anaesthesiology*. 2000; 13, 463-468.
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry*. 1999;45(9):1085-98.
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell. Death Differ*. 2004a; 11: 372–380.
- Rao RV, Poksay KS, Castro-Obregon S, Schilling B, Row RH, del Rio G, Gibson BW, et al. Molecular components of a cell

death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2004b; 279:177–187.

Réus GZ1, Stringari RB, de Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. *Oxid Med Cell Longev.* 2010; 3(5): 325-331.

Réus GZ, Nacif MP, Abelaira HM, Tomaz DB, dos Santos MA, Carlessi AS, Matias BI, da Luz JR, Steckert AV, Jeremias GC, Scaini G, Morais MO, Streck EL, Quevedo J1. Ketamine treatment partly reverses alterations in brain derived-neurotrophic factor, oxidative stress and energy metabolism parameters induced by an animal model of depression. *Curr Neurovasc Res.* 2015a;12:73-84.

Réus GZ, Carlessi AS, Titus SE, Abelaira HM, Ignácio ZM, da Luz JR, Matias BI, Bruchchen L, Florentino D, Vieira A, Petronilho F, Quevedo J. A single dose of S-ketamine induces long-term antidepressant effects and decreases oxidative stress in adulthood rats following maternal deprivation. *Dev Neurobiol.* 2015b; 75: 1268-1281.

Réus GZ1, Abaleira HM2, Titus SE2, Arent CO3, Michels M4, da Luz JR3, dos Santos MA3, Carlessi AS3, Matias BI3, Bruchchen L3, Steckert AV3, Ceretta LB5, Dal-Pizzol F4, Quevedo J6. Effects of ketamine administration on the phosphorylation levels of CREB and TrKB and on oxidativedamage after infusion of MEK inhibitor. *Pharmacol Rep.* 2016;68(1):177-84.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8: 519-529.

Rotte A, Pasham V, Bhandaru M, Bobbala D, Zelenak C, Lang F. Rapamycin sensitive ROS formation and Na(+)/H(+) exchanger activity in dendritic cells. *Cell Physiol Biochem.* 2012; 29:543-50.

- Sanacora G, Gueorguieva R, Epperson CN, et al. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2004; 61:705–713.
- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature rev*. 2008; 7: 426-437.
- Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38: 995–1014.
- Schmidt FM1, Kirkby KC, Lichtblau N. Inflammation and Immune Regulation as Potential Drug Targets in Antidepressant Treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(7):674-87.
- Schroder M. The unfolded protein response. *Mol Biotechnol*. 2006; 34: 279-290.
- Shah PJ, Ebmeier KP, Glabus MF, Goodwin GM. Cortical grey matter reductions associated with treatment resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry* 1998; 172:527–532.
- Sheline Y, Wang P, Gado M, Csernansky J, Vannier M. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:3908–3913.
- Sheline YI. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry*. 2003;54(3):338-52.
- Sieling PA, Porcelli SA, Duong BT, et al. Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. *J Immunol*. 2000; 165: 5338–5344.
- Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18:5856–5864.
- Sousa JE, Sousa AG, Costa MA, Abizaid AC, Feres F. Use of rapamycin-impregnated stents in coronary arteries. *Transplant Proc*. 2003; 35:165S–170S.

- Stockmeier CA1, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HB, Friedman L, Rajkowska G. Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry*. 2004;56(9):640-50.
- Suthammarak W, Somerlot BH, Opheim E, Sedensky M, Morgan PG. Novel interactions between mitochondrial superoxide dismutases and the electron transport chain. *Aging Cell*. 2013; 12:1132–1140.
- Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011; 13:184–190.
- Tain LS, Mortiboys H, Tao RN, Ziviani E, Bandmann O, Whitworth AJ. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci*. 2009; 12:1129– 1135.
- Tang J, Xue W, Xia B, Ren L, Tao W, Chen C, Zhang H, Wu R, Wang Q, Wu H, Duan J, Chen G. Involvement of normalized NMDA receptor and mTOR-related signaling in rapid antidepressant effects of Yuejuand ketamine on chronically stressed mice. *Sci Rep*. 2015; 5:13573.
- Taniguchi T, Kanakura H, Takemoto Y, Kidani Y, Yamamoto K. Effects of ketamine and propofol on the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 during endotoxemia in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2003; 200:85–92.
- Thomas GV, Tran C, Mellinghoff IK, Welsbie DS, Chan E, Fueger B, Czernin J, Sawyers CL. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med*. 2006; 12:122–127.
- Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature reviews. Immunology*. 2009; 9:324–337.
- Tremblay F, Brûlé S, Hee Um S, Li Y, Masuda K, Roden M, Sun XJ, Krebs M, Polakiewicz RD, Thomas G, Marette A. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in

- nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:14056–14061.
- Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, et al. STAR*D Study Team. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*. 2006;163:28–40.
- Tsytyler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase I restores proteostasis. *Science*. 2011; 332: 91-94.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. 2004; 431:200–205.
- Vasconcelos GS, Ximenes NC, de Sousa CN, Oliveira TQ, Lima LL, de Lucena DF, et al. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. *Schizophr Res*. 2015; S0920-9964:00190-00195.
- Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol*. 2005; 16:525–537.
- Wagner AE1, Walton JA, Hellyer PW, Gaynor JS, Mama KR. Use of low doses of ketamine administered by constant rate infusion as an adjunct for postoperative analgesia in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2002; 221:72-75.
- Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011; 334: 1081-1086.
- Wang J, Yang X, Zhang J. Bridges between mitochondrial oxidative stress, ER stress and mTOR signaling in pancreatic β cells. *Cell Signal*. 2016; 28: 1099-1104.
- Wang X, Luo YX, He YY, Li FQ, Shi HS, Xue LF, Xue YX, Lu L. Nucleus accumbens core mammalian target of rapamycin

- signaling pathway is critical for cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *J Neurosci.* 2010; 30:12632–12641.
- Warren BL, Iñiguez SD, Alcantara LF, Wright KN, Parise EM, Weakley SK, Bolaños-Guzmán CA. Juvenile administration of concomitant methylphenidate and fluoxetine alters behavioral reactivity to reward-and mood related stimuli and disrupts ventral tegmental area gene expression in adulthood. *J Neurosci.* 2011; 31:10347-10358.
- Wu J, McCallum SE, Glick SD, Huang Y. Inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway by rapamycin blocks cocaine-induced locomotor sensitization. *Neuroscience.* 2011; 172: 104–109.
- Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, Tagawa Y, Okamura M, Ogata R, Huang T, Nakajima S, Yao J, Paton AW, Paton JC, Kitamura M. Activation of the Akt–NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J Immunol.* 2009; 183:1480–1487.
- Yang, C, Zhou ZQ, Gao ZQ, Shi JY, Yang JJ. Acute increases in plasma mammalian target of rapamycin, glycogen synthase kinase-3 β , and eukaryotic elongation factor 2 phosphorylation after ketamine treatment in three depressed patients. *Biological Psychiatry.* 2013; 73:e35-6.
- Yu Y, Shen H, Zeng LL, Ma Q, Hu D. Convergent and divergent functional connectivity patterns in schizophrenia and depression. *PLoS ONE.* 2013;8: 7.
- Zarate CA, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry.* 2006; 63: 856-864.
- Zhang Y, Yang JH. Activation of the PI3K/Akt pathway by oxidative stress mediates high glucose-induced increase of adipogenic differentiation in primary rat osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2013; 114:2595–2602.
- Zhou CF1, Ji J, Yuan F, Shi M, Zhang J, Liu BY, Zhu ZG. mTOR activation in well differentiated pancreatic

neuroendocrine tumors: a retrospective study on 34 cases. *Hepatogastroenterology*. 2011;58(112):2140-2143.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; 12:21–35.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense Comissão de Ética no Uso de Animais

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex e pela Lei Federal 11.794/08, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 031-2014-01

Professor responsável: Josiane Budni

Equipe: Helena M. Abelaira, Maria Augusta B. Santos, Gislaine Z. Réus

Título: "Investigação dos mecanismos moleculares subjacentes ao efeito antidepressivo da Cetamina".

*Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA. Foi autorizada a utilização do total de 400 Ratos Wistar de 60 dias pesando aproximadamente 350 g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.*

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 031-2014-01

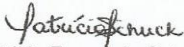
Principal Investigator: Josiane Budni

Researchers: Helena M. Abelaira, Maria Augusta B. Santos, Gislaine Z. Réus

Project title: Investigation of molecular mechanisms underlying the antidepressant effect of Ketamine

*The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.*

Criciúma, 25 de março de 2014.


Patricia Fernanda Schuck
Coordenadora da CEUA