

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ZULEIDE MARIA IGNÁCIO**

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DA QUETIAPINA COMO  
ESTRATÉGIA FARMACOLÓGICA NO TRATAMENTO DA  
DEPRESSÃO**

**CRICIÚMA  
2016**



**ZULEIDE MARIA IGNÁCIO**

**ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DA QUETIAPINA COMO  
ESTRATÉGIA FARMACOLÓGICA NO TRATAMENTO DA  
DEPRESSÃO**

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<sup>ª</sup>. Dra. Gislaine Zilli Réus

**CRICIÚMA  
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

I24e Ignácio, Zuleide Maria.

Estudo pré-clínico da quetiapina como estratégia farmacológica no tratamento da depressão / Zuleide Maria Ignácio ; orientador: João Luciano de Quevedo ; coorientadora: Gislaine Zilli Résus. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

127 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2016.

1. Quetiapina – Uso terapêutico. 2. Depressão – Tratamento. 3. Cadeia respiratória mitocondrial. 4. Exresse oxidativo. 5. Estresse nitrosativo. I. Título.

CDD 22. ed. 615.1

Bibliotecária Rosangela Westrupp – CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC



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 **Zuleide Maria Ignácio** sob o título “**Estudo pré-clínico da quetiapina como estratégia farmacológica no tratamento da depressão**”, 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, 25 de agosto de 2016.

**Prof. Dr. FELIPE DAL PIZZOL**  
Membro Relator – UNESC

**Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO**  
Membro Interno – UNESC

**Prof. Dr. MARCELO LIBORIO SCHWARZBOLD**  
Membro Externo - UFSC

**Prof.ª Dr.ª MANUELLA PINTO KASTER**  
Membro Externo - UFSC

**Prof.ª Dra. Josiane Budni**  
Representante do Orientador João Quevedo

**Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza**  
Coordenador 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 sobre a atividade enzimática da cadeia respiratória mitocondrial foram realizados no Laboratório de Bioenergética do PPGCS da UNESC.

Os ensaios bioquímicos sobre a atividade enzimática de acetilação de histonas e metilação de DNA foram realizados no Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia do PPGCS da UNESC.

Os ensaios bioquímicos sobre o estresse oxidativo e nitrosativo 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 companheiro Alceu, por sempre acreditar e me apoiar, nos momentos bons e nos mais difíceis da nossa jornada acadêmica e da vida; aos meus filhos maravilhosos, Eder, Guilherme e Pedro, os quais são a minha maior inspiração para seguir em frente e ser exemplo de dedicação à ciência e à vida; aos meus pais, Maria e Pedro, que me ensinaram os princípios da vida, da ética e da humildade; às minhas irmãs, meu irmão e toda a minha família que sempre apostaram em mim e contribuem para que tenhamos uma grande família unida e maravilhosa.”*





## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu companheiro Alceu por sempre acreditar na minha capacidade e lutar junto comigo para que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus filhos que sempre tiveram paciência com minha carga de ocupação nos estudos e muitas vezes falta de tempo para acompanhar suas conquistas e diversões.

Agradeço aos meus pais, meus irmãos e toda a minha família, que sempre me apoiaram e foram solidários comigo na minha grande jornada.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. João Quevedo, por ter acreditado na minha capacidade e pela oportunidade de estudar em um laboratório de excelência, onde a pesquisa flui e é naturalmente compartilhada.

Agradeço a minha co-orientadora Professora Dra. Gislaine Z. Réus, pela acolhida e pela serenidade em coordenar o grupo, de forma que todos os integrantes se sintam parte do todo. Agradeço também por ter apostado na minha capacidade de contribuir.

Agradeço imensamente a Helena Abelaira, minha companheira do cotidiano na condução dos experimentos na bancada e em todas as situações do doutorado, nas quais sempre se colocou à disposição para me ajudar no que fosse necessário.

Agradeço a Amanda Maciel, minha grande companheira de bancada, principalmente nos finais de semana e feriados, cujos momentos de silêncio no laboratório também nos deram oportunidades de trocarmos grandes idéias sobre a ciência e a vida.

Agradeço a Maria Augusta, que também foi uma grande companheira de pesquisa.

Agradeço à Paula Tonin e a Amanda Steckert, pelo carinho e pelos bons momentos de descontração no laboratório.

Agradeço aos alunos de iniciação científica, Airam, Danyela, Júlia Bardini, Thays e Carol que sempre humildemente se colocaram a disposição e continuam contribuindo para que tenhamos um maravilhoso grupo de pesquisa.

Agradeço a todos os professores e colegas das demais equipes do NEUROLAB, pois juntos formamos uma grande equipe entusiasmada pelas neurociências.



Agradeço a coordenação do curso de enfermagem da UFFS, aos professores do NPPD e a todos os professores que lutaram para que pudéssemos alcançar a tão almejada licença para capacitação.

Agradeço a banca examinadora pelo importante debate científico e pelas excelentes contribuições para o aperfeiçoamento do trabalho final.



*"Se cada dia cai, dentro de cada  
noite, há um poço onde a claridade  
está presa.*

*Há que sentar-se na beira do poço  
da sombra e pescar luz caída com  
paciência."*

Pablo Neruda



## RESUMO

As causas e mecanismos biológicos do transtorno depressivo maior (TDM) são multifatoriais. Possivelmente, como consequência da heterogeneidade de fatores, as respostas aos tratamentos são ainda bastante inconsistentes, exigindo um longo período para estabelecer uma resposta terapêutica e, ainda, um grande percentual de pacientes é refratário aos antidepressivos clássicos ou outras estratégias terapêuticas. O estresse no início da vida e alguns mecanismos fisiológicos inerentes a ele parecem envolvidos na depressão resistente a tratamentos (DRT). A quetiapina, um antipsicótico atípico, exerce resposta terapêutica e induz alterações fisiológicas que parecem subjacentes à DRT. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar em estruturas cerebrais o efeito do tratamento agudo e crônico (14 dias) com quetiapina sobre parâmetros bioquímicos que refletem as atividades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM), da enzima creatina quinase (CK) e o estresse oxidativo. Além disso, avaliar o efeito da administração aguda e crônica da quetiapina sobre o comportamento semelhante à depressão no teste de natação forçada (TNF) e do tratamento crônico (14 dias), no comportamento tipo depressivo de ratos submetidos à privação materna (PM), bem como sobre atividades enzimáticas de histonas acetiltransferases (HAT), histonas desacetilases (HDAC) e DNA metiltransferases (DNAMT) nos animais submetidos a PM. A atividade enzimática da CRM variou de acordo com a concentração de quetiapina (20, 40 ou 80 mg/kg), a região cerebral e o tratamento agudo (uma injeção i.p.) ou crônico (14 dias). De uma forma geral a atividade dos complexos I a III foi aumentada, especialmente após a administração aguda. A administração aguda aumentou a atividade do complexo IV e da CK na amígdala, enquanto o complexo I foi inibido no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens. A quetiapina reduziu o tempo de imobilidade no TNF após o tratamento agudo (20 mg/kg). Após o tratamento crônico, a quetiapina reduziu o tempo de imobilidade e aumentou o tempo de escalada. Sobre os parâmetros do estresse oxidativo, o tratamento agudo (20 mg/kg) reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na amígdala. Após tratamento crônico (14 dias), a MPO foi reduzida na amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo.





Também, após tratamento crônico, os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram reduzidos na amígdala e núcleo accumbens, e o conteúdo de proteínas carbonilas foi reduzido no córtex pré-frontal. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) aumentou no núcleo accumbens, após os tratamentos agudo e crônico. A atividade catalase (CAT) aumentou no córtex pré-frontal após o tratamento agudo e no núcleo accumbens após os tratamentos agudo e crônico. A concentração de nitrito/nitrato reduziu no córtex pré-frontal após tratamento crônico. O estresse da PM induziu um comportamento tipo depressivo, aumentando a imobilidade no TNF e também aumentou atividade da HDAC e da DNAMT no hipocampo e núcleo accumbens. O tratamento crônico com a quetiapina (20mg/kg) reduziu a imobilidade no TNF e a atividade da DNAMT no hipocampo. Os resultados indicam que a quetiapina tem um perfil antioxidante e apresenta efeito possivelmente benéfico sobre a CRM. A quetiapina promoveu efeito do tipo antidepressivo e, nos animais PM, também interferiu positivamente em mecanismos epigenéticos hipocampais, um fenômeno que, possivelmente, está associado à atividade transcricional no hipocampo.

**Palavras-chave:** quetiapina; depressão; cadeia respiratória mitocondrial; estresse oxidativo; privação materna; epigenética.



## ABSTRACT

The biological mechanisms of major depressive disorder (MDD) are multifactorial. Possibly, as a consequence of the heterogeneity of factors, therapeutic responses typically take a long time to occur. In addition, many patients do not respond to the classical antidepressants. Stress in early life and some physiological mechanisms associated to stress appear to be involved in treatment-resistant depression (TRD). Quetiapine, an atypical antipsychotic, exerts therapeutic response and induces physiological changes that seem to underlie the TRD. Therefore, the aim of this study was to analyze the effects of acute and chronic treatments with quetiapine on biochemical parameters, such as activities of the enzymatic complexes of the mitochondrial respiratory chain (MRC), creatine kinase (CK) enzyme and oxidative stress in the rat brain. Also, we evaluated the effects of acute and chronic administration of quetiapine on depressive-like behavior in forced swimming test (FST) and chronic treatment in depressive-like behavior of animals subjected to maternal deprivation (MD), as well as the activities of histone acetyl transferases (HAT), histone deacetylases (HDAC) and DNA methyltransferases (DNAMT) in MD rats. The enzymatic activity of MRC was altered according to the concentration of quetiapine (20, 40 or 80 mg/kg), and brain region. Complex I-III activity was increased, especially after acute quetiapine administration. Acute administration increased the activity of complex IV and CK in the amygdala, while the complex I was inhibited in the prefrontal cortex and nucleus accumbens. Quetiapine reduced the immobility time in the FST after acute treatment. After chronic treatment quetiapine reduced the immobility time and increased climbing time. Acute treatment (20 mg/kg) reduced the activity of the myeloperoxidase enzyme (MPO) in the amygdala. After chronic treatment (14 days), MPO was reduced in the amygdala, prefrontal cortex and hippocampus. Also, after chronic treatment, the levels of thiobarbituric reactive species (TBARS) were reduced in the amygdala and nucleus accumbens, and the carbonyl protein content was reduced in the prefrontal cortex. The superoxide dismutase (SOD) enzyme activity increased in the nucleus accumbens after acute and chronic treatments. The catalase (CAT) activity increased in the prefrontal cortex after acute treatment and in the



nucleus accumbens after acute and chronic treatments. The concentration of nitrite/nitrate was reduced in the prefrontal cortex after chronic treatment. The MD stress induced depressive-like behavior, increasing immobility time in the FST, and increased the activity of HDAC and DNAMT in the hippocampus and nucleus accumbens. Treatment with quetiapine (20 mg/kg) reduced the immobility in the FST and DNAMT activity in the hippocampus. The results indicate that quetiapine has an antioxidant profile and possibly exerts beneficial effect on the MRC. Quetiapine promoted antidepressant-like effect and positively altered hippocampal epigenetic mechanisms of MD rats, a phenomenon that is possibly associated with transcriptional activity in the hippocampus.

**Keywords:** quetiapine; depression; mitochondrial respiratory chain; oxidative stress; maternal deprivation; epigenetics.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático do protocolo de PM e tratamento crônico .....	51
Figura 2 - Atividade do complexo I da CRM - Efeito agudo e crônico .....	60
Figura 3 - Atividade do complexo II da CRM - Efeito agudo e crônico .....	61
Figura 4 - Atividade do complexo II-III da CRM - Efeito agudo e crônico .....	62
Figura 5 - Atividade do complexo IV da CRM - Efeito agudo e crônico .....	63
Figura 6 – Atividade da enzima CK – Efeito agudo e crônico.....	65
Figura 7 – Efeito agudo com três doses de quetiapina sobre a locomoção espontânea no teste do campo aberto. ....	67
Figura 8 - Efeito agudo e crônico da quetiapina no teste de natação forçada .....	68
Figura 9 - Efeito agudo e crônico da quetiapina sobre a atividade da enzima MPO .....	70
Figura 10 - Efeito agudo e crônico da quetiapina nos níveis de TBARS .....	71
Figura 11 - Efeito agudo e crônico da quetiapina nos níveis de proteínas carbonil .....	73
Figura 12 - Efeito agudo e crônico da quetiapina sobre a atividade da SOD .....	75
Figura 13 - Efeito agudo e crônico da quetiapina sobre a atividade da CAT .....	76
Figura 14 - Efeito agudo e crônico da quetiapina sobre a concentração de nitrito/nitrato .....	77





Figura 15 – Efeito da PM e da administração crônica de quetiapina sobre a locomoção espontânea no teste do campo aberto e a mobilidade no teste de natação forçada .....	79
Figura 16 – Efeito da PM e da administração crônica de quetiapina sobre a atividade das enzimas HAT, HDAC e DNAMT .....	81



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>31</b>
1.1 DEPRESSÃO.....	31
1.2 DEPRESSÃO E MODELOS ANIMAIS .....	34
1.3 REGIÕES CEREBRAIS ENVOLVIDAS NA DEPRESSÃO.....	36
1.4 PLASTICIDADE, FATORES NEUROTÓFICOS E DEPRESSÃO .....	36
1.5 CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL (CRM), CREATINA QUINASE (CK) E DEPRESSÃO .....	37
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E DEPRESSÃO.....	39
1.7 MECANISMOS EPIGENÉTICOS E DEPRESSÃO.....	41
1.8 QUETIAPINA .....	43
1.9 JUSTIFICATIVA .....	47
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>48</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	48
3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	48
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	49
<b>3.3.1 Tratamento agudo e crônico com quetiapina em animais sem estresse .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3.2 Privação materna – Tratamento crônico com quetiapina e teste de natação forçada.....</b>	<b>50</b>
3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA .....	52
3.5 AVALIAÇÃO DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA .....	52
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	52
<b>3.6.1 Atividade da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) e da creatina quinase (CK) .....</b>	<b>52</b>
3.6.1.1 Preparação do tecido e homogenato.....	52
3.6.1.2 Avaliação da atividade da CRM e da CK .....	53
<b>3.6.2 Procedimento de análise de estresse oxidativo .....</b>	<b>54</b>
3.6.2.1 Preparação do tecido e homogenato .....	54
3.6.2.2 Atividade da enzima mieloperoxidase – MPO .....	54
3.6.2.3 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS .....	54



3.6.2.4	Formação de proteínas carbonil .....	55
3.6.2.5	Atividade da enzima superóxido dismutase – SOD .....	56
3.6.2.6	Atividade da enzima catalase – CAT .....	56
3.6.2.7	Medida da concentração de nitrito/nitrato .....	56
<b>3.6.4</b>	<b>Análise de acetilação de histonas e metilação de DNA .....</b>	<b>56</b>
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
4.1	EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM QUETIAPINA SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CRM .....	58
4.2	EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM QUETIAPINA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA CK .....	64
4.3	EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM QUETIAPINA SOBRE A ATIVIDADE NO CAMPO ABERTO .....	66
4.4	EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM QUETIAPINA NOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS AVALIADOS NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA .....	66
4.5	EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM QUETIAPINA SOBRE PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	69
<b>4.5.1</b>	<b>Atividade da enzima mieloperoxidase – MPO .....</b>	<b>69</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS .....</b>	<b>69</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Formação de proteínas carbonil .....</b>	<b>72</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Atividade da enzima superóxido dismutase – SOD .....</b>	<b>74</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Atividade da enzima catalase – CAT .....</b>	<b>74</b>
<b>4.5.6</b>	<b>Medida da concentração de nitrito/nitrato .....</b>	<b>77</b>
4.6	EFEITO DO ESTRESSE DE PRIVAÇÃO MATERNA E TRATAMENTO COM QUETIAPINA NOS TESTES DE NATAÇÃO FORÇADA E ATIVIDADE LOCOMOTORA NO CAMPO ABERTO .....	78
4.7	EFEITO DO ESTRESSE DE PM E TRATAMENTO COM QUETIAPINA SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EPIGENÉTICOS .....	79
<b>4.7.1</b>	<b>Atividade de histonas desacetilases – HDAC.....</b>	<b>79</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Atividade de histonas acetiltransferases – HAT.....</b>	<b>80</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Atividade de DNA metiltransferases – DNAMT.....</b>	<b>80</b>



<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÃO .....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEPRESSÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o transtorno depressivo maior (TDM) ocupava em 2004 o primeiro lugar no ranque das principais causas de incapacitação não fatal, o terceiro lugar em carga global de incapacidade e a estimativa é que ocupará o primeiro lugar em 2030, entre as doenças com maior carga global (WHO 2008).

O TDM é um transtorno grave que tem enormes prejuízos para a qualidade de vida das pessoas e é uma das formas mais prevalentes de doença mental (Larsen et al., 2010). Além disso, pacientes que sofrem de depressão severa apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, com consequências econômicas e sociais profundas (Nemeroff e Owens, 2002). Além dos sérios prejuízos aos quais o paciente é submetido durante o estado depressivo, é importante destacar que a depressão é uma doença crônica e recorrente (Keller et al., 1992; Mueller et al., 1999), frequentemente cursando com constante preocupação e expectativas ruins. É importante também enfatizar que o TDM é altamente predisponente ao suicídio (Cuijpers e Smit, 2002).

A patogênese do TDM e os mecanismos de ação dos antidepressivos disponíveis para uso atualmente na clínica ainda não são claramente entendidos (Leuchter et al., 2010). Os estudos apontam que o TDM envolve causas e mecanismos biológicos multifatoriais, envolvendo fatores genéticos e ambientais e a interação entre esses fatores (Caspi et al., 2003; Ignácio et al., 2014). Possivelmente, como consequência da heterogeneidade de fatores, as respostas aos tratamentos são ainda bastante inconsistentes (Belmaker e Agam, 2008). Comorbidades e uma relação bidirecional com diversas patologias são apontadas em vários estudos, sendo que entre elas estão: dor, diabetes, doenças cardíacas, alterações autoimunes, além de prejuízos cognitivos associados (Demyttenaere et al., 2006; Barnes et al., 2006; Weissman et al., 2006; aan het Rot et al., 2009). Adicionalmente, a depressão apresenta comorbidade com vários transtornos psiquiátricos, sendo que algumas das comorbidades parecem estar envolvidas na pobre resposta a tratamentos com antidepressivos clássicos (De Carlo et al., 2016).

Vários estudos mostram que o TDM tem um componente familiar altamente prevalente (Marazita et al., 1997; Holmans et al.,

2007), com a herdabilidade transcorrendo em várias gerações, com indicativos precoces na vida das, em grande parte na adolescência (Weissman et al., 2005; Weissman et al., 2006). Entretanto, como em outros transtornos psiquiátricos, o TDM mais frequentemente pode estar associado a fenômenos genéticos mais complexos, como a epistasia e a epigenética (Burmeister, 1999; Ignácio et al., 2014).

O entendimento acerca dos sistemas de neurotransmissão, como base subjacente aos mecanismos fisiopatológicos do TDM, emergiu a partir da ação na recaptção de monoaminas, exercida por substâncias com efeito antidepressivo, culminando posteriormente na hipótese monoaminérgica, formulada em meados dos anos 1960 (Belmaker, e Agam, 2008). Esta hipótese sugere que a depressão envolve uma deficiência ou desequilíbrio nos neurotransmissores monoaminérgicos, tais como dopamina, serotonina (5-HT) e norepinefrina (NE). Entre os agentes terapêuticos, os antidepressivos tricíclicos (ATC), inibidores da monoamina oxidase (IMAO) e inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS) exercem sua ação terapêutica através de sua capacidade em aumentar o conteúdo sináptico dos neurotransmissores monoaminérgicos (Morilak e Frazer, 2004). Embora as ações dos fármacos mais utilizados na clínica envolvam o sistema monoaminérgico, o efeito terapêutico após longo prazo de tratamento parece estar associado a mecanismos celulares e bioquímicos ainda bastante desconhecidos. Evidências indicam que os fatores neurotróficos e neurogênicos mediam as adaptações neurais envolvidas na resposta de longo prazo após o uso crônico dos antidepressivos clássicos (Schmidt et al., 2008; Hodes et al., 2010; Ignácio et al., 2014).

Considerando o longo tempo de latência para o efeito terapêutico, os efeitos colaterais e o fato de um número significativo de pacientes não responderem aos tratamentos com os antidepressivos disponíveis atualmente, as pesquisas devem focalizar sobre a necessidade de novos agentes terapêuticos com ação rápida e que sejam mais seguros e efetivos para o tratamento do TDM (Berton e Nestler, 2006).

Recentemente, muitas pesquisas têm propiciado emergir novas teorias sobre a fisiopatologia da depressão e possíveis mecanismos de ações dos antidepressivos, considerando os processos neurobiológicos subjacentes à plasticidade neuronal e sináptica e os fatores convergentes entre todas as evidências (Sanacora et al., 2008; Zarate e Manji, 2008).

Portanto, a investigação pré-clínica de mecanismos subjacentes à ação de fármacos já utilizados na clínica, além de contribuir para desvendar os mecanismos fisiopatológicos, é um meio importante para descobertas de novos agentes com possibilidades de maior eficácia, menos efeitos colaterais e que possam ser responsivos a todos ou, se não, a um número bem maior de pacientes que sofrem de TDM.

## 1.2 DEPRESSÃO E MODELOS ANIMAIS

Ao longo dos últimos 50 anos muitos modelos animais de depressão foram desenvolvidos, os quais tem se mostrado cruciais para as descobertas e desenvolvimento de fármacos efetivos clinicamente para o transtorno (McArthur e Borsini, 2006). Em algumas doenças neurológicas, como o Parkinson, Alzheimer ou Huntington, os modelos animais têm se apresentado com bastante vantagens, tendo em vista principalmente, porque algumas características genéticas já são conhecidas, enquanto que nos transtornos de humor, os critérios de validade quase sempre não estão presentes em um único modelo (Nestler et al., 2002; Cryan et al., 2002).

Há bastante tempo também que a ciência vem discutindo e propondo características para que os modelos animais de pesquisa possam ser transponíveis para a espécie humana. Desta forma, alguns critérios foram teorizados e exigidos para a validade de um modelo na pesquisa científica. Entre alguns fenômenos já discutidos, um modelo válido de transtorno psiquiátrico deve apresentar três critérios: validade de face, a qual determina que o modelo deve evidenciar nos animais, similaridades com o fenótipo do transtorno avaliado; validade de constructo, cuja exigência é que o modelo possa reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos do transtorno; e validade preditiva, a qual preconiza que o modelo deve permitir a extrapolação do efeito de uma manipulação experimental de uma espécie para outra, como por exemplo, os efeitos de agentes farmacológicos (van der Staay et al., 2009; Abelaira et al., 2013).

Existem alguns modelos animais de depressão, através dos quais a investigação de novos agentes farmacológicos é um dos principais objetivos (McArthur e Borsini, 2006), além da investigação de mecanismos fisiopatológicos do transtorno (Nestler et al., 2002; Cryan e Slattery, 2007). Entretanto, um dos mais amplamente utilizados, o teste de natação forçada ou modelo de desespero comportamental (Cryan e Holmes, 2005) não é essencialmente um modelo animal de

depressão, mas um teste comportamental com potente validade preditiva (Yan et al., 2010). Esse teste foi descrito inicialmente por Porsolt et al. (1977a), quando os pesquisadores observaram o desespero comportamental de ratos confinados em um cilindro com água. Nesse teste os animais nadam vigorosamente e escalam as paredes, tornando-se imóveis posteriormente. Os mesmos autores verificaram que agentes antidepressivos como também os choques eletroconvulsivos reduziram a imobilidade de ratos e camundongos, mostrando que o procedimento é sensível a antidepressivos (Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b). Inúmeros estudos vêm mostrando que agentes antidepressivos reduzem a imobilidade dos animais (Cryan e Slattery, 2007; Garcia et al., 2008a; Réus et al., 2011), caracterizando um modelo com validade preditiva (Abelaira et al., 2013). Além disso, o próprio teste é um potente estressor e também é sensível a alterações comportamentais geradas por outros estressores ou condições fisiológicas que podem estar subjacentes à depressão (Bogdanova et al., 2013).

Outro modelo comportamental, o estresse de privação materna em roedores, foi proposto por Levine et al. (1956), com objetivo de comparar os efeitos de longa duração que ocorrem em pessoas que sofreram estresse traumático na infância, como abandono, negligência de cuidados, abuso sexual, entre outros eventos estressantes. Muitos estudos vêm utilizando o modelo com o objetivo de avaliar alterações comportamentais e mecanismos biológicos envolvidos na depressão, mostrando que o modelo pode estar inerente a alterações em diversos mecanismos fisiológicos (Levine, 2001; Pryce et al., 2002; McArthur e Borsini, 2006; Réus et al., 2013; Réus et al., 2015). Um aspecto de fundamental importância é o fato de que o estresse no início da vida parece estar envolvido na pobre resposta a tratamentos antidepressivos, tanto em humanos (Nanni et al., 2012; Williams et al., 2016), quanto em animais submetidos ao protocolo de privação materna (Zhang et al., 2015). Portanto, o protocolo de privação materna torna-se importante para o estudo de características biológicas e procedimentos terapêuticos direcionados a terapias mais efetivas a pacientes com depressão resistente a tratamentos (TRD).

### 1.3 REGIÕES CEREBRAIS ENVOLVIDAS NA DEPRESSÃO

Estudos clínicos e pré-clínicos têm evidenciado perda neuronal e atrofia cerebral como resultado de estresse e depressão. As áreas que mais sofrem os efeitos do estresse são o hipocampo, principalmente as

áreas piramidais CA3 (Sapolsky, 1996), e o córtex pré-frontal (Drevets et al., 1997; Duman et al., 1999; Abdallah et al., 2016). O estresse também diminui a neurogênese no giro denteado de animais adultos (Gould et al., 1997). Esses efeitos danosos decorrentes do estresse podem contribuir para a redução do volume do hipocampo e córtex pré-frontal, registrado em pacientes com depressão ou com transtorno de estresse pós-traumático (Bremner et al., 1995; Sheline et al., 1996; Drevets et al., 1997). Estudos com pacientes que apresentaram depressão em diferentes estágios da vida, mostraram que o transtorno quando iniciado em fase mais jovem está relacionado com maior redução do hipocampo, enquanto que pacientes que apresentaram o primeiro episódio em fase mais tardia, tiveram maior redução do córtex entorinal, sugerindo que as áreas cerebrais afetadas podem estar relacionadas com a idade de início e o tempo de curso da depressão (Gerritsen et al., 2011).

Estudos de ressonância magnética (MRI) mostram consistentemente que o tamanho do córtex pré-frontal é reduzido em pacientes adultos com TDM, em comparação com indivíduos saudáveis. Dados de estudos *post-mortem* apoiam esta conclusão e sugerem que as células da glia podem, pelo menos em parte, contribuir para o tamanho total reduzido da região (Ongur et al., 1998).

Ao contrário do córtex pré-frontal e do hipocampo, os quais têm a atividade e volume reduzidos no TDM, a amígdala possui a atividade e a morfologia aumentadas (Drevets, 2003). Adicionalmente, estudos de imagem mostraram um aumento no volume da amígdala em pacientes (Bremner et al., 2000; Lange e Irle, 2004) e em parentes de primeiro grau de indivíduos com TDM (Romanczuk-Seiferth et al., 2014). O estresse aumentou a plasticidade sináptica e a função de neurônios na amígdala, um efeito distinto da atrofia encontrada no hipocampo e córtex pré-frontal. Além disso, o tratamento com antidepressivos produziu efeito oposto ao produzido pelo estresse nas estruturas límbicas. Essas alterações encontradas na amígdala 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 accumbens. O núcleo accumbens desempenha um papel central nos mecanismos de recompensa e já foram mostradas alterações estruturais e funcionais no TDM, as quais

foram relacionadas aos sintomas de anedonia (Dunn et al., 2002; Nestler e Carlezon, 2006).

Os dados das pesquisas com relação à plasticidade neural mostram que o estresse pode exercer diversos efeitos em diferentes regiões e funções cerebrais, um fato que impulsiona as pesquisas na busca dos mecanismos subjacentes aos diversos efeitos do estresse. Entre os diversos mecanismos neurais, a função de neurotransmissores, além dos monoaminérgicos, como também, mecanismos celulares de ação, fatores neurotróficos e plasticidade neuronal, de acordo com a evolução das pesquisas, parece formar um conjunto importantíssimo de mecanismos para a compreensão da fisiopatologia do TDM.

#### 1.4 PLASTICIDADE, FATORES NEUROTRÓFICOS E DEPRESSÃO

Nos últimos anos, um número significativo de estudos vem investigando a transdução de sinal intracelular bem como a plasticidade celular na fisiopatologia e tratamento da depressão (Pittenger e Duman, 2008). O fato de haver um tempo de latência para a resposta terapêutica aos antidepressivos leva a hipótese de que a alteração na quantidade de neurotransmissores na fenda sináptica não seja suficiente para estabelecer alterações em longo prazo. Mecanismos funcionais e estruturais, tais como o aumento da neurogênese, crescimento das fibras nervosas, formação de novas sinapses e estabilização das já existentes podem ser as consequências das atividades intracelulares nas vias de transdução dos neurotransmissores e neuromoduladores (Gonçalves e Coelho, 2006).

Várias pesquisas vêm observando o envolvimento do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na patogênese da depressão (Altar, 1999; Rasmusson et al., 2002; Lang et al., 2004; Calabrese et al., 2009; Kimpton, 2012). Em animais, as pesquisas têm mostrado que o estresse agudo e crônico provoca redução da expressão do RNAm e da proteína BDNF hipocampal (Smith et al., 1995; Vaidya et al., 1999a,b; Roceri et al., 2002; Duman e Monteggia, 2006). Em estudos *post-mortem*, alguns autores observaram que o BDNF e seu receptor estavam diminuídos no hipocampo (Dwivedi et al., 2003; Banerjee et al., 2013) e córtex pré-frontal (Dwivedi et al., 2003) de vítimas de suicídio. Algumas pesquisas também observaram que os níveis plasmáticos de BDNF estavam significativamente reduzidos em indivíduos deprimidos que fizeram tentativas de suicídio (Kim et al., 2007; Kavalidou e De Leo, 2013).

Adicionalmente ao fator protetor do BDNF na morfofisiologia cerebral relacionada à patogênese da depressão, alguns estudos têm evidenciado um papel antidepressivo deste fator neurotrófico administrado diretamente no hipocampo e em outras regiões cerebrais (Shirayama et al., 2002; Hoshaw et al., 2005; Castrén et al., 2007).

Outra neurotrofina que tem sido relacionada aos transtornos de humor é o fator de crescimento neuronal (NGF). As pesquisas trazem evidência de que o NGF promove o crescimento e sobrevivência de neurônios, bem como promove a sua reparação e remodelação. Também é relatado que o NGF é necessário para controlar a função sináptica e a neuroplasticidade (Allewaert e Santucci, 2001; Aloe et al., 2002). Em modelos animais de depressão, foram observadas em várias regiões cerebrais, alterações nos níveis de NGF e BDNF de animais com comportamento depressivo (Angelucci et al., 2000). Um estudo mais recente mostrou uma redução do NGF no córtex frontal de animais estressados (Schulte-Herbrüggen et al., 2006).

## 1.5 CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL (CRM), CREATINA QUINASE (CK) E DEPRESSÃO

O principal recurso de energia das células vem do processo de fosforilação oxidativa que ocorre na membrana interna das mitocôndrias. O processo requer a função de enzimas respiratórias, as quais estão organizadas de forma complexa na denominada cadeia respiratória mitocondrial (CRM) ou cadeia de transporte de elétrons (Berg et al., 2002). A cadeia de transporte de elétrons é composta por cinco complexos enzimáticos (complexos I, II, III, IV e V) e dois componentes que não fazem parte dos complexos, a coenzima Q, que transporta elétrons do complexo I e II ao complexo III, e o citocromo *c*, que transporta elétrons do complexo III ao complexo IV. Os elétrons presentes nas coenzimas NADH e FADH<sub>2</sub> são transferidos para o complexo I e para o complexo II, respectivamente. A partir dos complexos I e II, os elétrons são transferidos para a coenzima Q, depois para o complexo III, citocromo *c*, complexo IV e finalmente para o complexo V ou ATP sintase (Boekema e Braun, 2007).

O cérebro é um tecido com alta demanda de energia e contém um grande número de mitocôndrias, sendo, portanto, bastante susceptível à redução do metabolismo aeróbico. A disfunção mitocondrial está implicada na patogênese de uma série de doenças que

afetam o cérebro, como a demência, isquemia cerebral, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (Blass, 2001). Alguns estudos vêm mostrando que crianças e adultos, com alterações mitocondriais podem apresentar TDM, entre outros transtornos psiquiátricos (Morava et al., 2010; Mancuso et al., 2013). Alguns pesquisadores propõem que as alterações mitocondriais estão envolvidas em transtornos psiquiátricos (Manji et al., 2012). Além disso, muitos pacientes com transtornos psiquiátricos podem ter alteração não diagnosticada da função mitocondrial (Anglin et al., 2014). Estudos com humanos e com modelos animais apontam uma relação entre o TDM, disfunção mitocondrial e doenças neurodegenerativas (Jou et al., 2009; Streck et al., 2014). A atividade dos complexos I-III e II-III da CRM foi reduzida em cérebro de ratos após estresse crônico (Madrigal et al., 2001). A atividade dos complexos I, III e IV da CRM foi reduzida no córtex cerebral e cerebelo, após estresse crônico (Rezin et al., 2008; Rezin et al., 2009). Alguns autores observaram que o estresse de privação materna e o estresse crônico moderado, além de aumentar a imobilidade no teste de natação forçada, induziram redução da atividade de complexos da CRM em tecido cerebral de ratos. A redução da atividade de complexos da CRM, como também a imobilidade foram revertidas após administração de butirato de sódio, um inibidor de HDAC (Valvassori et al., 2015). A redução da atividade dos complexos da CRM também foi revertida com administração aguda de cetamina, um antidepressivo com efeito rápido (Rezin et al., 2009). Em um estudo *post-mortem* de pacientes com TDM, Ben-Shachar e Karry (2008) observaram no cerebelo, redução de RNAm e proteínas das subunidades NDUFV1, NDUFV2 NADUFS1 do complexo I. Hroudova e Fisar (2010), em um estudo *in vitro* com cortex cerebral de porco, demonstraram que a atividade do complexo I, II e IV diminuiu sob a ação de vários antidepressivos e estabilizadores de humor, sugerindo que os antidepressivos, inibindo algumas funções na cadeia de transporte de elétrons, podem regular a função mitocondrial no sistema nervoso central.

A creatina quinase (CK) desempenha uma função importante no metabolismo dos tecidos que apresentam alta demanda energética, tais como o cérebro, onde ela funciona como um sistema de tamponamento eficaz através dos níveis celulares de adenosina trifosfato (ATP). A enzima catalisa a reversível transferência do grupo fosforil da fosfocreatina para adenosina difosfato (ADP), regenerando o ATP



(Bessman e Carpenter, 1985). A atividade da CK foi diminuída em cérebro de ratos submetidos a um modelo animal de mania (Streck et al., 2008). Alguns autores observaram que os antidepressivos imipramina, paroxetina e a cetamina aumentaram a atividade da CK no cérebro de ratos (Assis et al., 2009; Santos et al., 2009), indicando que a modulação do metabolismo energético por antidepressivos pode ser um importante mecanismo da ação desses fármacos. Segal et al. (2007) avaliaram os níveis séricos de CK em uma amostra obtida de indivíduos com TDM em episódio depressivo psicótico e não-psicótico. Adicionalmente a amostra incluía sujeitos com transtorno esquizoafetivo e transtorno bipolar que se apresentavam em episódios depressivos. Os resultados apontaram para um aumento nos níveis de CK na depressão não psicótica, comparado aos outros grupos.

A literatura também traz evidências de que prejuízos na função mitocondrial podem estar relacionados a aumento no estresse oxidativo e que essas alterações podem gerar um ciclo vicioso, sendo que o estresse oxidativo e nitrosativo estão relacionados a disfunção mitocondrial (Federico et al., 2012). Portanto, a avaliação de parâmetros relacionados ao balanço oxidativo é um dos procedimentos importantes nos estudos dos mecanismos fisiológicos envolvidos na depressão.

## 1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E DEPRESSÃO

Além de alterações na função mitocondrial e metabolismo energético, entre outros processos biológicos, muitos estudos tem destacado que alterações no balanço oxidativo são mecanismos importantes envolvidos na patogênese da depressão (Zhou et al., 2007; Jou et al., 2009; Streck et al., 2014; Che et al., 2015; Garabadu et al., 2015). Além disso, o sucesso de alguns antidepressivos clássicos foi atribuído à redução no estresse oxidativo e inflamação (Rawdin et al., 2013).

Os principais radicais livres formados no organismo são as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). Aproximadamente 5% do oxigênio inalado é convertido a ERO (Harman, 1993). A redução do oxigênio na cadeia mitocondrial forma intermediários reativos, tais como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) (Pandya et al., 2013). O radical óxido nítrico (NO) é formado a partir da oxidação de um dos átomos terminais da L-arginina, cujo processo é catalizado pela enzima óxido nítrico sintetase (Ferret et al., 2000). Além disso, dependendo dos

constituintes do microambiente, o NO pode ser convertido a várias outras espécies reativas de nitrogênio, como o cátion nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ), ânion nitroxyl ( $\text{NO}^-$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Hughes, 1999).

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

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio na produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes, resultando em prejuízo para o organismo (Fedorova et al., 2014). O excesso de espécies reativas propicia a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Halliwell e Whiteman, 2004). Entre as alterações biológicas importantes, estão incluídas 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).

A geração de EROs constitui, por excelência, um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Porém, a produção excessiva pode conduzir a um desbalanço entre a geração de espécies reativas e as defesas antioxidantes, culminando em danos oxidativos (Ferreira e Matsubara, 1997; Shami e Moreira, 2004). O estresse oxidativo é um dos grandes vilões envolvidos em diversos mecanismos do sistema nervoso central, como no aumento de morte celular, na redução da plasticidade neuronal e neurogênese, em aumento de respostas autoimunes em doenças neurodegenerativas (Floyd, 1999; Shukla et al., 2011; Moylan et al., 2013). O aumento de EROs também pode interagir de forma prejudicial com o aumento de óxido nítrico (NO), pois a formação do peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) pode culminar na nitração de proteínas e neurotoxicidade (Calabrese et al., 2007).

O cérebro é especialmente vulnerável ao estresse oxidativo e nitrosativo porque tem alta taxa metabólica (Maes et al., 2011) e, conseqüentemente, alta taxa de consumo de oxigênio (Che et al., 2015), acoplados a menores níveis médios de antioxidantes (Maes et al., 2011). Além disso, o cérebro é altamente vulnerável à peroxidação lipídica devido à grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas neuronais (Valko et al., 2007).

Alguns estudos mostraram que ratos submetidos ao estresse crônico moderado tiveram aumento na produção de superóxido, no hipocampo, córtex pré-frontal e córtex cerebral e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um indicativo de peroxidação lipídica, no córtex (Lucca et al., 2009a). Em outro estudo também foi demonstrado que os ratos submetidos ao estresse tiveram um aumento de peroxidação de proteínas no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex; na peroxidação lipídica no cerebelo e estriado; na CAT no cerebelo, hipocampo, estriado e córtex e uma diminuição na atividade da SOD no córtex pré-frontal, estriado, hipocampo e córtex (Lucca et al., 2009b). Um fator importante é que o desbalanço oxidativo em pacientes com depressão foi reduzido após o tratamento com antidepressivos clássicos (Bilici et al., 2001; Behr et al., 2012; Lee et al., 2013). Estudos com animais também relataram efeitos antioxidantes da imipramina, um antidepressivo tricíclico, e harmina, um inibidor de monoamina oxidases, no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos, corroborando outros estudos acerca da atividade antioxidante de antidepressivos (Réus et al., 2010). Antidepressivos também diminuíram os danos oxidativos e as respostas inflamatórias associadas, em animais submetidos ao protocolo de privação materna (Réus et al., 2015a, Réus et al., 2015b)

O estresse oxidativo e a vulnerabilidade do cérebro, juntamente com as crescentes evidências de alterações degenerativas associadas com os transtornos psiquiátricos, indicam que o dano oxidativo está relevantemente envolvido nos transtornos de humor.

## 1.7 MECANISMOS EPIGENÉTICOS E DEPRESSÃO

A epigenética é o estudo de alterações hereditárias na expressão de genes, as quais não envolvem alterações nas sequências de DNA (Wolffe e Matzke 1999). Os fenômenos epigenéticos podem explicar a regulação de genomas pelo meio ambiente e a relação dos fatores ambientais no início da vida com os efeitos fenotípicos que ocorrem ao longo da vida (Lutz e Turecki, 2014).

A epigenética inclui três processos bastante conhecidos e estudados: metilação de DNA, modificações pós translacionais em proteínas histonas e alteração de RNA não codificante (RNAnc) (Lister et al., 2009; Lutz e Turecki, 2014).

A metilação do DNA consiste na adição covalente de um grupo metil na posição 5' para um resíduo citosina, através de enzimas DNA metiltransferases (DNAMT) (Jones e Takai, 2001), principalmente quando a citosina é seguida por uma guanina com uma ligação fosfodiéster, uma sequência denominada de ilha citosina-fosfato-guanina (CpG) (Lister et al., 2009). Essas ilhas CpG são muitas vezes localizadas próximas a uma região promotora de transcrição genética (Bird, 1986). A metilação aumentada de citosinas nas ilhas CpG está associada com transcrição genética reduzida (Jones e Takai, 2001).

A acetilação de resíduos de lisina nas histonas reduz a afinidade entre as proteínas e o DNA, promovendo um relaxamento da estrutura da cromatina e também aumentando o recrutamento, a estabilização e a ativação da maquinaria transcricional (Marmorstein e Trievel, 2009). Os níveis de acetilação ao longo da cromatina são determinados pelo balanço entre as enzimas histona acetiltransferase (HAT), a qual adiciona grupos acetil, e histona deacetilase (HDAC), a qual remove os grupos de acetil de resíduos de lisina nas histonas (Kuo e Allis, 1998). O balanço entre as atividades das enzimas HAT e HDAC determina o estado de acetilação, que por sua vez, influencia o nível de expressão do gene subjacente (Kouzarides, 2007).

Mecanismos epigenéticos podem moderar os riscos ambientais e genéticos para transtornos de humor (Kinnally et al., 2010). Alterações epigenéticas induzidas por estresse na infância estão incluídas entre os principais focos de pesquisa sobre os mecanismos biológicos envolvidos na depressão, em modelos animais e em humanos (Dalton et al., 2014). Alguns estudos têm mostrado que a privação dos cuidados maternos leva a alterações genéticas até a vida adulta. Ratos que receberam poucos cuidados maternos desenvolveram comportamentos dos tipos depressivos e ansiosos (Weaver et al., 2004). Interessantemente inibidores de HDAC diminuíram a metilação do DNA, e também reduziram os comportamentos de depressão e ansiedade desses animais (Weaver et al., 2004). Um estudo também mostrou que o estresse por privação materna desencadeou um aumento da atividade de HDAC no núcleo accumbens de ratos adultos, paralelamente a um aumento de comportamento tipo depressivo (Réus

et al., 2013). Em humanos, vítimas de suicídio e com histórico de abuso sexual na infância, também foi demonstrado um aumento na metilação do DNA (McGowan et al., 2009).

Neste sentido, esses novos estudos têm sugerido que a cromatina é um importante substrato para alterações de longa duração relacionadas ao estresse e tratamento com antidepressivos. Os mecanismos pelos quais o estresse ambiental leva a alterações na cromatina ainda não foram elucidados, no entanto, estudos têm sugerido que manipulações farmacológicas capazes de remodelar a cromatina podem constituir novos alvos para o desenvolvimento de antidepressivos (Renthal e Nestler, 2008).

## 1.8 QUETIAPINA

A quetiapina foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1997, como um antipsicótico atípico com estabelecida eficácia no tratamento da esquizofrenia (Cheer e Wagstaff, 2004).

Vários estudos demonstraram a eficácia clínica da quetiapina para o transtorno de humor bipolar (Berk e Dodd, 2005; Calabrese et al., 2005; Croissant et al., 2006; Vieta et al., 2008; Suppes et al., 2009), para tratamento dos problemas de comportamento e distúrbios na demência (Savaskan et al., 2006) e para o tratamento dos transtornos de dependência de substâncias (Sattar et al., 2004; Croissant et al., 2006). Além disso, os efeitos positivos da quetiapina na arquitetura e recuperação do sono em indivíduos saudáveis (Cohrs et al., 2004), bem como a promoção do sono na depressão também foram relatados (Todder et al., 2006).

Enquanto a quetiapina demonstrou eficácia na esquizofrenia e no transtorno bipolar, bem como no tratamento de especificação de sintomas aglomerados, tais como agitação e problemas de sono em transtornos de humor, estudos mais recentes mostraram a eficácia, segurança e tolerabilidade da quetiapina no TDM (Baune, 2008; Vieta et al., 2008; Suppes et al., 2009) e transtorno de ansiedade geral (Baune, 2008), bem como no tratamento de pacientes não responsivos a outros antidepressivos clássicos e na depressão associada a psicoses e ansiedade (Daly e Trivedi, 2007). Adicionalmente, também foi demonstrada a função terapêutica da quetiapina em ratos com comportamento depressivo induzido por estresse crônico e não responsivos ao tratamento com fluoxetina (Wang et al., 2013). A ação da quetiapina e do seu metabólito ativo N-desalquil quetiapina no

bloqueio do transportador de noradrenalina (NET) e no antagonismo aos receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, é considerada uma razão possível para seus efeitos antidepressivos (Altamura et al., 2012).

Estudos mostraram que a quetiapina apresenta baixa potência aos receptores D<sub>2</sub>, baixa afinidade aos receptores D<sub>1</sub> e muscarínicos e é um antagonista mais potente do receptor 5-HT<sub>2</sub> do que os antipsicóticos típicos. As propriedades de ligação da quetiapina aos receptores são complexas, e parece pouco provável que um mecanismo único poderia explicar os efeitos observados no TDM e nos transtornos de ansiedade (Saller e Salama, 1993). Suas propriedades como agonista parcial 5-HT<sub>1A</sub>, como também como potente inibidor do NET, através do seu metabólito N-desalquil quetiapina, parecem os mecanismos, pelo menos em parte, envolvidos na terapêutica da depressão (Jensen et al, 2008; Cross et al., 2016). O metabólito ativo da quetiapina possui uma afinidade para o receptor de histamina H<sub>1</sub> e para o NET, aos receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2B</sub>, 5HT<sub>7</sub>, aos receptores muscarínicos M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>5</sub> e aos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. O composto possui baixa afinidade para os receptores 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>,  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2C}$ , H<sub>2</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub> e também para os receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> (Baune, 2008). A quetiapina aumenta a liberação de dopamina no córtex pré-frontal, através do antagonismo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e  $\alpha_2$ -adrenérgicos e de agonismo parcial sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Os autores sugerem que este aumento da dopamina no córtex pré-frontal possa ser um dos mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo, possivelmente melhorando os sintomas afetivos e cognitivos subjacentes ao TDM (Prieto et al., 2010). Estudos indicam que a quetiapina não altera a expressão de receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) no estriado, o que, juntamente com a baixa afinidade aos receptores D<sub>2</sub>, pode estar relacionado à redução de efeitos extrapiramidais (Tascadda et al., 1999).

O possível papel da quetiapina em receptores, como os glutamatérgicos ainda está sendo estudado (Prieto et al., 2010). Entretanto, estudos já mostraram que a quetiapina, administrada cronicamente em ratos, reduziu significativamente os níveis de RNAm das subunidades NR1 e NR2C do receptor NMDA no núcleo accumbens e promoveu um aumento nos níveis de RNAm das subunidades GluR-B e GluR-C e da expressão da subunidade GluR-B do receptor AMPA no hipocampo (Tascadda et al., 1999).

Outros mecanismos importantes, onde a quetiapina está envolvida incluem a neurogênese e a função do BDNF. Estudos mostraram que a quetiapina reduziu os efeitos negativos do estresse crônico sobre a proliferação celular e a expressão de BDNF no hipocampo. Os mesmos autores mostraram uma interação entre a quetiapina e a venlafaxina, aumentando os efeitos positivos sobre a proliferação celular e expressão do BDNF (Xu et al., 2006). Outros estudos mostraram que a quetiapina administrada cronicamente reverteu a redução da proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (CREB) fosforilada e da neurogênese hipocampal, induzidas por estresse crônico em ratos (Luo et al., 2005). Estes últimos pesquisadores sugerem que as alterações na CREB e neurogênese hipocampal, bem como a expressão de BDNF observada em outros estudos, possam constituir os mecanismos subjacentes ao efeito terapêutico da quetiapina na cognição de pacientes com esquizofrenia e depressão. A neurogênese paralela ao efeito antidepressivo promovido pela quetiapina também foi demonstrada em ratos submetidos a estresse crônico e não responsivos à fluoxetina (Wang et al., 2013).

A neuroinflamação, um fenômeno fisiológico importantíssimo também envolvido no TDM e outros transtornos psiquiátricos, é um mecanismo alvo da quetiapina. Bian et al. (2008) verificaram que entre outros antipsicóticos atípicos, a quetiapina inibiu a liberação de óxido nítrico e TNF- $\alpha$  a partir da microglia ativada, sugerindo que um de seus possíveis efeitos na redução da neurodegeneração pode estar subjacente aos mecanismos neuroimunes. Outro fator importante é que a quetiapina apresenta função antagonista e alta afinidade por receptores histaminérgicos H<sub>1</sub>, os quais regulam positivamente algumas citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, a quetiapina também poderá estar interferindo em processos inflamatórios envolvidos na neurodegeneração (McIntyre et al., 2007).

Outra observação importante sobre a quetiapina foi a sua função no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Os níveis do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e do cortisol foram significativamente reduzidos no plasma de pessoas saudáveis, sob o efeito agudo da quetiapina. Os autores sugerem que o efeito da quetiapina sobre o eixo HPA provavelmente está relacionado ao bloqueio de receptores serotoninérgicos, mas não desconsideram o envolvimento dos receptores adrenérgicos e histaminérgicos (Cohrs et al., 2006). Em pacientes com TDM, a quetiapina, administrada cronicamente, juntamente com o

escitalopram, um ISRS, inibiu a atividade do eixo HPA, um efeito que não ocorreu a partir da monoterapia com escitalopram, sugerindo uma função mais efetiva da quetiapina (Nothdurfter et al., 2014). Outro estudo mostrou que após uma semana de tratamento, a atividade HPA foi significativamente reduzida e correlacionada com o efeito antidepressivo da quetiapina, enquanto que o escitalopram induziu um aumento significativo após uma semana. Entretanto, a atividade HPA voltou aos níveis basais após cinco semanas com escitalopram, enquanto que com a quetiapina, a atividade HPA reduzida foi recuperada parcialmente após cinco semanas (Sarubin et al., 2014).

Outros mecanismos fisiológicos celulares envolvidos nos transtornos psiquiátricos e doenças neurodegenerativas, tais como o estresse oxidativo, a função mitocondrial no metabolismo energético e os fenômenos epigenéticos, os quais são alvos de importantes estudos recentes envolvendo o TDM, emergem como mecanismos relevantes a serem investigados no estudo de substâncias farmacológicas já em uso na clínica ou com perspectiva de uso terapêutico. Embora ainda poucos os estudos, a quetiapina já vem sendo apontada como tendo função antioxidante, conforme observado em estudos *in vitro* (Dietrich-Muszalska et al., 2011) e em estudos *in vivo* (Kropp et al., 2005). Na função da CRM, a quetiapina parece interferir na expressão de enzimas da cadeia respiratória (Ji et al., 2009), porém, a alteração da função mitocondrial pela quetiapina ainda carece de muitos estudos para que se possa entender acerca do seu papel positivo ou negativo. Sobre os fenômenos epigenéticos, a literatura científica é também bastante carente de trabalhos envolvendo a quetiapina. Entretanto, dois estudos recentes demonstraram a participação da quetiapina em mecanismos epigenéticos no SNC. Guidotti et al. (2011) trazem evidências do envolvimento positivo da quetiapina na desmetilação de regiões promotoras de genes relacionados à transmissão gabaérgica na esquizofrenia e transtorno do humor bipolar. Outro trabalho mais recente mostrou que em células neuroblastoma humano, a quetiapina promoveu hipometilação de regiões promotoras de vários genes, incluindo o gene para o receptor  $\alpha 1$ -adrenérgico e o gene para o transportador da serotonina (Sugawara et al., 2015). Estes dados indicam que a quetiapina pode atuar em processos epigenéticos de genes importantes envolvidos nos mecanismos fisiológicos do TDM.



## 1.9 JUSTIFICATIVA

As evidências de que a quetiapina promove efeito antidepressivo, além dos estudos mostrando o envolvimento da quetiapina em mecanismos fisiológicos subjacentes à depressão e à pobre resposta a antidepressivos clássicos, indicam a relevância de mais estudos sobre este fármaco. Além da busca dos mecanismos subjacentes aos efeitos da quetiapina, os estudos também poderão auxiliar na evolução do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na depressão.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração aguda ou crônica de quetiapina sobre a atividade da CRM, CK, parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, bem como sobre alterações moleculares epigenéticas cerebrais e em comportamentos de ratos submetidos a estresse por PM.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de três doses de quetiapina na atividade dos complexos enzimáticos da CRM (I, II, II-III e IV) no córtex pré frontal, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens de ratos;
2. Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de três doses de quetiapina sobre a atividade da enzima CK no córtex pré frontal, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens de ratos;
3. Avaliar os efeitos da administração aguda de quetiapina sobre a atividade motora e exploratória, através do teste do campo aberto;
4. Avaliar o efeito tipo antidepressivo da quetiapina administrada agudamente e cronicamente em ratos, através do teste de natação forçada;
5. Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de quetiapina sobre os níveis de proteínas carbonil, TBARs e sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no

- córtex pré frontal, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens de ratos;
6. Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de quetiapina sobre a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré frontal, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens de ratos;
  7. Avaliar os efeitos da administração aguda e crônica de quetiapina sobre a atividade das enzimas CAT e SOD no córtex pré frontal, hipocampo, amígdala e núcleo accumbens de ratos;
  8. Avaliar os efeitos da administração crônica de quetiapina sobre a atividade motora e exploratória de ratos, através do teste do campo aberto, e da administração crônica no mesmo teste em animais submetidos ao protocolo de PM;
  9. Avaliar o efeito do tipo antidepressivo da quetiapina administrada cronicamente em ratos submetidos ao protocolo de PM;
  10. Avaliar os efeitos da administração crônica de quetiapina sobre a atividade de HDAC, HAT e DNAMT no córtex pré frontal, hipocampo e núcleo accumbens de ratos submetidos ao protocolo de PM.

### **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). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo número 82/2012.

#### **3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Os animais (ratos Wistar) foram procedentes do biotério da UNESC. Para os protocolos com animais sem estresse de PM, foram utilizados ratos machos com aproximadamente 60 dias de idade. Para os

protocolos de PM, foram utilizados ratos machos com um dia de idade, por 10 dias de privação, conforme protocolo descrito no item 3.3.2 e figura 1. Após o protocolo de PM, os animais permaneceram em seus alojamentos, com as respectivas mães. Foram desmamados com 21 dias de idade e foram utilizados posteriormente, com 50 dias de idade. Os animais foram acondicionados em cinco animais por caixa, com ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00 às 19:00, com luz iniciando às 7:00), comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido à temperatura de  $23 \pm 1^\circ \text{C}$ .

### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

#### **3.3.1 Tratamento agudo e crônico com quetiapina em animais sem estresse**

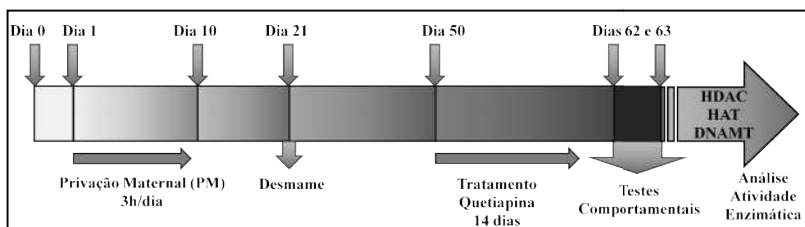
Animais que não foram submetidos a protocolos de estresse de PM ( $n = 6$  por grupo de tratamento agudo e crônico), receberam quetiapina nas doses de 20 mg/kg, 40mg/kg e 80mg/kg, diluída em salina, ou imipramina (controle positivo) na dose de 30 mg/kg, diluída em salina. Os animais controles receberam somente salina. No tratamento agudo foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) uma única dose de quetiapina ou imipramina ou salina. No tratamento crônico foi administrada uma dose diária de quetiapina, imipramina ou salina, durante 14 dias. Uma hora após o tratamento agudo e a última administração no tratamento crônico, os animais foram mortos por decapitação e o cérebro foi removido imediatamente. Foram separados o hipocampo, córtex pré-frontal, amígdala e núcleo accumbens, os quais foram manualmente isolados com auxílio de uma lupa, uma espátula e um pincel fino. Em seguida foram armazenados em freezer com temperatura a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior análise da atividade enzimática dos complexos da CRM e da enzima CK, conforme protocolo 3.6.1. A dissecação foi baseada nas diferenças histológicas descritas por Paxinos e Watson (1986).

A partir da análise da atividade dos complexos da CRM e do teste de atividade locomotora no campo aberto, foi optado por analisar o efeito da administração aguda e crônica da quetiapina na dose de 20mg/kg sobre os mecanismos epigenéticos e os parâmetros do estresse oxidativo, bem como sobre os parâmetros comportamentais. Um fator que foi levado em consideração pela escolha posterior de uma concentração mais baixa, foi o fato de a dose de 80 mg/kg de quetiapina

ter induzido efeito sedativo, uma característica importante do fármaco, a qual está bem descrita na literatura e que também foi considerada na discussão deste trabalho.

### **3.3.2 Privação materna (PM) - Tratamento crônico com quetiapina e teste de natação forçada**

Após o primeiro dia do nascimento os filhotes foram privados da mãe durante 3 horas por dia, durante os 10 primeiros dias. A privação consistiu em retirar os filhotes da caixa e manter a mãe na caixa original. Os animais não privados permaneceram imperturbáveis na gaiola original com sua mãe. As caixas em ambos os grupos só foram trocadas no 11<sup>o</sup> dia após o período pré-natal. Os ratos foram desmamados no 21<sup>o</sup> dia após o nascimento e apenas os machos foram utilizados para o estudo. As fêmeas foram doadas para outros grupos de pesquisa. Todos os experimentos foram realizados apenas quando os animais atingiram a vida adulta, ou seja, 50 dias de idade. Aos 50 dias de idade, os animais foram submetidos a um tratamento crônico com quetiapina na dose de 20 mg/kg, ou salina durante 14 dias. No 13<sup>o</sup> dia de tratamento os animais foram submetidos a um teste de 5 minutos no campo aberto, 60 (sessenta) minutos após o tratamento, para avaliação da atividade locomotora. Após o teste no campo aberto os animais foram submetidos a uma sessão de treino de 15 minutos no teste de natação forçada (pré-teste). O teste de natação forçada, com duração de 5 (cinco) minutos, foi realizado no 14<sup>o</sup> dia, também 60 minutos após o tratamento farmacológico. Após o teste de natação forçada os animais foram mortos por decapitação e o cérebro foi removido imediatamente. Foram separados o hipocampo, córtex pré-frontal e núcleo accumbens, os quais foram manualmente isolados com auxílio de uma lupa, uma espátula e um pincel fino. Em seguida foram armazenados em freezer com temperatura a -80°C para posteriores análises da atividade das enzimas HDAC, HAT e DNAMT. A dissecação foi baseada nas diferenças histológicas descritas por Paxinos e Watson (1986). O desenho experimental está esquematizado na figura 1.



**Figura 1.** Desenho esquemático do protocolo de PM e tratamento crônico com quetiapina (14 dias; 20 mg/kg). Os procedimentos de privação materna foram realizados durante 10 dias, após o primeiro dia pós-natal. O tratamento farmacológico iniciou quando os animais atingiram 50 dias de idade. Os testes comportamentais (campo aberto e nado forçado) foram realizados nos 62<sup>o</sup> e 63<sup>o</sup> dias de idade. Após o último teste comportamental, amostras cerebrais (hipocampo, Córtex pré-frontal e núcleo accumbens) foram retiradas e armazenadas para a análise das atividades enzimáticas.

### 3.4 PROCEDIMENTO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA

A atividade locomotora foi realizada no campo aberto, uma caixa de 40 x 60 cm, cercada por três paredes de madeira compensada e uma parede frontal de vidro, ambas com 50 cm de altura, e assoalho dividido em 9 (nove) retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados delicadamente no quadrante posterior esquerdo, para que explorassem a arena por 5 minutos, onde foram contados os cruzamentos entre as linhas pretas e a quantidade de vezes em que o rato ficou apoiado nas patas traseiras a fim de explorar o ambiente (levantamentos).

### 3.5. PROCEDIMENTO DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

Este teste consistiu em dois dias de procedimentos, nos quais cada rato foi posto individualmente em um cilindro com água à temperatura de 23°C. O cilindro foi preenchido com água suficiente para que o animal não conseguisse apoiar as patas no fundo. No primeiro dia os ratos foram forçados a nadar durante 15 minutos. No segundo dia, 24 h após o treino de 15 minutos, cada animal foi novamente forçado a nadar durante 5 minutos. Foram avaliados os parâmetros de imobilidade, os quais são constituídos de imobilidade total ou movimentos para manter a cabeça fora da água sem intenção de escapar (Porsolt et al., 1977a).

### 3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

#### **3.6.1 Atividade da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) e da creatina quinase (CK)**

##### 3.6.1.1 Preparação do tecido e homogenato

Amostras de tecidos do córtex pré frontal, hipocampo, amígdala e o núcleo accumbens 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 min a 4°C. Os sobrenadantes foram mantidos a -80°C, até serem usados para a determinação da atividade enzimática. O intervalo máximo entre a preparação do homogenato e a análise enzimática foi sempre inferior a cinco dias. A concentração de

proteína foi determinada pelo método descrito por Lowry et al. (1951). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

### 3.6.1.2 Avaliação da atividade dos complexos da CRM e da enzima CK

A atividade da NADH desidrogenase (complexo I) foi avaliada usando o método descrito por Cassina e Radi (1996), relacionando com a taxa de redução de ferrocianeto dependente de NADH a 420 nm. As atividades da succinato-2,6-dicloroindofenol (2,6-DCIP) oxidorreductase (Complexo II) e succinato: citocromo *c* oxidorreductase (Complexo II-III) foram determinados pelo método descrito por Ficher et al. (1985). A atividade do complexo II foi medida seguindo a diminuição na absorbância devido à redução da 2,6-DCIP a 600 nm. A atividade do complexo II-III foi medida pela redução do citocromo *c* a partir da succinato a 550 nm. A atividade da citocromo *c* oxidase (complexo IV) foi avaliada de acordo com o método descrito por Rustin et al. (1994), e a medida seguiu a diminuição na absorbância devido à oxidação do citocromo *c*, previamente reduzido a 550 nm e com comprimento de onda de referência a 580 nm ( $\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). O tampão da reação continha 10 mM de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,6 mM de n-dodecyl-D-maltoside, 2-4 lg do homogenado de proteínas. A reação foi iniciada com a adição de 0,7 lg de citocromo *c* reduzida. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C durante 10 minutos. As atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram calculadas como  $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$ .

Para a avaliação da atividade da enzima CK ( $n = 5$  por grupo) o meio de incubação foi composto por fosfocreatina, ADP e glutatona reduzida. A formação de creatina foi medida por um método colorimétrico de acordo com Hughes (1962). A atividade da CK foi medida no homogenado de tecidos pré tratados com lauril maltosido 0,625 mM. A mistura da reação consistiu de 60mM de Tris-HCl, pH 7,5, contendo 7 mM de fosfocreatina, 9 mM de  $\text{MgSO}_4$  e cerca de 0,4-1,2  $\mu\text{g}$  de proteína em um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Após 15 minutos de pré-incubação a 37°C, a reação foi iniciada com a adição de 3,2 mmol de ADP mais 0,8 mmol de glutatona reduzida. A reação foi finalizada após 10 minutos, pela adição de 1 mol de ácido p-hydroxymercuribenzoico. A cor foi desenvolvida pela adição de 100  $\mu\text{l}$  a 2% de  $\alpha$ -naphthol e 100  $\mu\text{l}$  a 0,05% de diacetil em um volume final de 1 ml. A leitura foi realizada espectrofotometricamente a 540 nm, após 20 minutos.

### 3.6.2 Procedimentos de análise de estresse oxidativo

#### 3.6.2.1 Preparação do tecido e homogenato

Amostras de tecidos do córtex pré frontal, hipocampo, amígdala e o núcleo accumbens 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°C. Os sobrenadantes foram mantidos a -80°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.

#### 3.6.2.2 Atividade da enzima mieloperoxidase - MPO

A atividade da MPO 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade foi medida espectrofotometricamente como a variação de absorbância em 650 nm a 37°C. Os dados foram representados como mU por mg de proteína.

#### 3.6.2.3 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - 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.



### 3.6.2.4 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.

### 3.6.2.5 Atividade da enzima superóxido dismutase - 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.

#### 3.6.2.6 Atividade da enzima catalase - CAT

A atividade da CAT foi medida através do método que utiliza o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para gerar H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

#### 3.6.2.7 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 H<sub>2</sub>O e 1% (w/v) de sulfanilamida em 5% (v/v) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 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.

### 3.6.3 Análise de acetilação de histonas e metilação de DNA

As amostras de tecido, córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo accumbens (n = 5 por grupo) congeladas a -80°C, foram submetidas a um protocolo de extração nuclear a partir de um kit específico (Sigma, St Louis, EUA). As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise citoplasmático contendo ditiotreitól (DTT) e inibidores de protease. A suspensão foi mantida em gelo durante 15 minutos e em seguida foi centrifugada a 250 x g durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo a fração citosólica foi rejeitado e o sedimento foi re-suspenso em dois volumes de tampão de lise citoplasmático frio. A suspensão foi homogeneizada usando uma seringa com uma agulha de calibre pequeno e centrifugada a 8000 x g durante 20 minutos, a 4°C. O sedimento foi re-

suspensão em um tampão de extração contendo inibidores de DTT e protease. A amostra resultante foi mantida em agitação lenta durante 30-60 minutos em um agitador orbital a 4°C. Após, a suspensão nuclear foi centrifugada a 16000 x g durante 5 minutos, a 4°C e o sobrenadante contendo o extrato nuclear foi transferido para outro tubo e armazenado a -80°C para análise posterior.

Os extratos nucleares a partir de córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo accumbens foram submetidos ao ensaio para avaliação de atividade enzimática das enzimas HDAC, HAT DNAMT (n = 5 para cada região e enzima), com o uso de kits de ensaio específicos para cada enzima (detecção fluorimétrica) de acordo com as instruções do fabricante (Sigma, St Louis, EUA). Resumidamente, as amostras de extrato nuclear foram misturadas com tampões de ensaio de HDAC (EPIGENTEK; catálogo base #P-4034), HAT (EPIGENTEK; catálogo base #P-4003) ou DNAMT (EPIGENTEK; catálogo base #P-3009), mais substrato de ensaio das respectivas enzimas, em uma placa de 96 poços e incubadas a 30°C, durante 45 minutos. Concomitantemente, uma curva padrão foi feita com diluições em série de substratos de kits de HDAC, HAT ou DNAMT, e também controles positivos e negativos foram adicionados à placa. Em seguida, a solução de revelação foi adicionada aos poços e a placa foi incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos. Uma leitura colorimétrica foi realizada em um leitor de fluorescência de placas com 450 nm para as atividades de HDAC e HAT e DNAMT.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). As diferenças entre os grupos experimentais na avaliação dos testes comportamentais 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

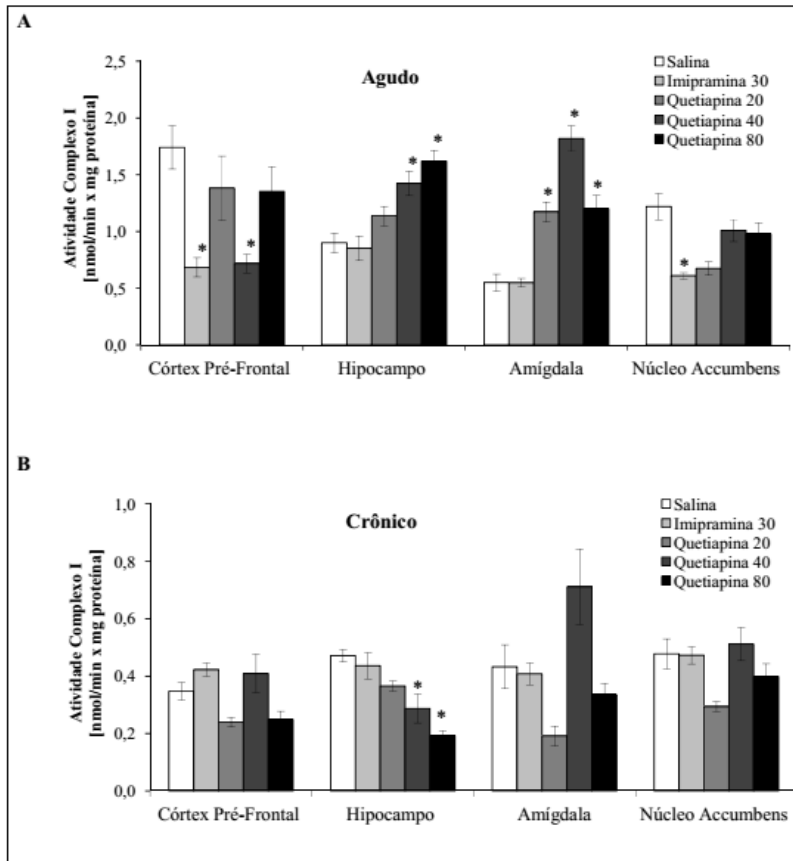
### 4.1 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM QUETIAPINA SOBRE A ATIVIDADE DOS COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

Como representado na figura 2A, a atividade do complexo I diminuiu no córtex pré-frontal de ratos tratados agudamente com imipramina (30 mg/kg) e quetiapina (40 mg/kg) (Figura 2A;  $F = 7,75$ ;  $p < 0,05$ ) e no núcleo accumbens de ratos tratados com imipramina (30 mg/kg) e quetiapina (20 mg/kg) (Figura 2A;  $F = 8,35$ ;  $p < 0,05$ ). No hipocampo, a atividade do complexo I aumentou com a quetiapina, nas doses de 40 mg/kg e 80 mg/kg (Figura 2A;  $F = 11,84$ ;  $p < 0,05$ ). Na amígdala a atividade do complexo I aumentou com a quetiapina nas doses de 20 mg/kg, 40 mg/kg e 80 mg/kg (Figura 2A;  $F = 29,41$ ;  $p < 0,05$ ). A figura 2B mostra os efeitos sobre a atividade do complexo I após o tratamento crônico. A atividade do complexo I diminuiu no hipocampo de ratos tratados cronicamente com as doses de 40 mg/kg e 80 mg/kg de quetiapina (Figura 2B;  $F = 20,40$ ;  $p < 0,05$ ).

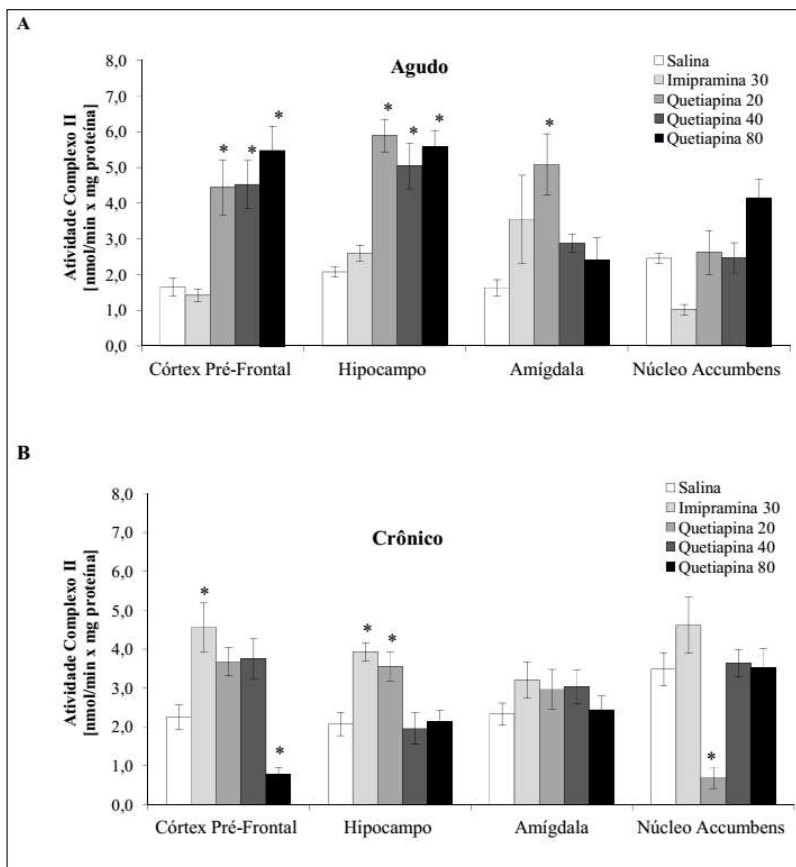
A figura 3 expressa a atividade do complexo II após administração aguda (Figura 3A) e crônica (Figura 3B). A atividade do complexo II aumentou significativamente no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos, após tratamento agudo com a quetiapina nas doses de 20, 40 e 80 mg/kg (Figura 3A;  $F = 11,17$ ;  $p < 0,05$ ) e (Figura 3A;  $F = 12,12$ ;  $p > 0,05$ ), respectivamente, e na amígdala de ratos tratados agudamente com quetiapina na dose de 20 mg/kg (Figura 3A;  $F = 3,76$ ;  $p < 0,05$ ). A atividade do complexo II de ratos que receberam tratamento crônico aumentou no córtex pré-frontal quando tratados com imipramina (30 mg/kg) e diminuiu na mesma região de ratos tratados com quetiapina na dose de 80 mg/kg (Figura 3B;  $F = 21,50$ ;  $p < 0,05$ ). No hipocampo, a atividade do complexo II aumentou com administração crônica de imipramina (30mg/kg) e de quetiapina (20 mg/kg) (Figura 3b;  $F = 7,79$ ;  $p < 0,05$ ). No núcleo accumbens, a atividade do complexo II diminuiu após tratamento crônico com a dose de 20mg/kg de quetiapina (Figura 3B;  $F = 7,62$ ;  $p < 0,05$ ).

Os resultados da atividade dos complexos II-III estão representados nas figuras 4A (tratamento agudo) e 4B (tratamento crônico). A atividade dos complexos II-III aumentou após o tratamento agudo com quetiapina nas doses de 20 e 40 mg/kg, nas seguintes regiões: córtex pré-frontal (Figura 4A;  $F = 7,84$ ;  $p < 0,05$ ), hipocampo

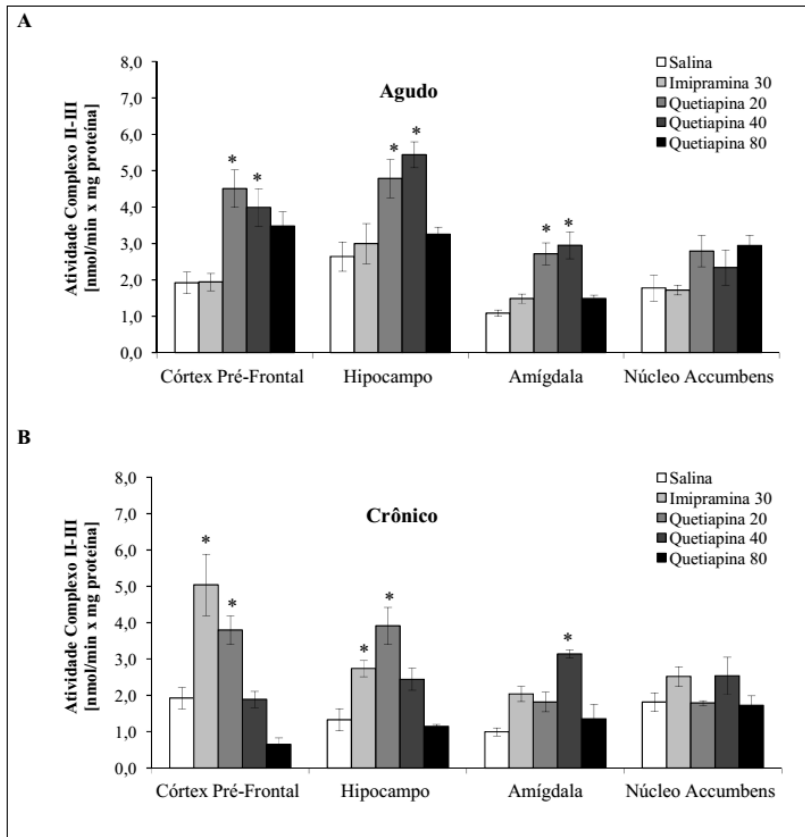
(Figura 4A;  $F = 7,84$ ;  $p < 0,05$ ) e amígdala (Figura 4A;  $F = 12,79$ ;  $p < 0,05$ ). Após o tratamento crônico, a atividade dos complexos II-III aumentou nas seguintes regiões e tratamentos: córtex pré-frontal com imipramina (30 mg/kg) e quetiapina (20 mg/kg) (Figura 4B;  $F = 16,17$ ;  $p < 0,05$ ), hipocampo, com imipramina (30 mg/kg) e quetiapina (20 mg/kg) (Figura 4B;  $F = 15,26$ ;  $p < 0,05$ ), e amígdala com quetiapina (40 mg/kg) (Figura 4B;  $F = 6,83$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20, 40 e 80 mg/kg) sobre a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ . (A) administração aguda; (B) administração crônica.



**Figura 3.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20, 40 e 80 mg/kg) sobre a atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial. A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ . (A) administração aguda; (B) administração crônica.

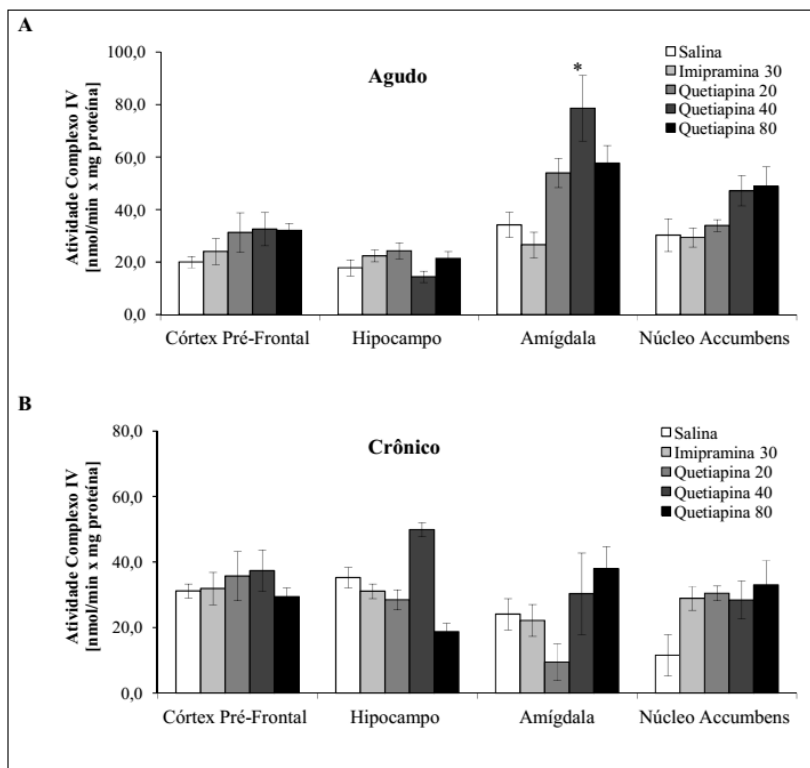


**Figura 4.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20, 40 e 80 mg/kg) sobre a atividade dos complexos II-III da cadeia respiratória mitocondrial. A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ . (A) administração aguda; (B) administração crônica.

A figura 5 representa os resultados da atividade do complexo IV em animais sob tratamento agudo (Figura 5A) e crônico (Figura 5B). A atividade do complexo IV aumentou na amígdala, após o tratamento agudo com a quetiapina, na dose de 40 mg/kg (Figura 5A;  $F = 7,72$ ;  $p$



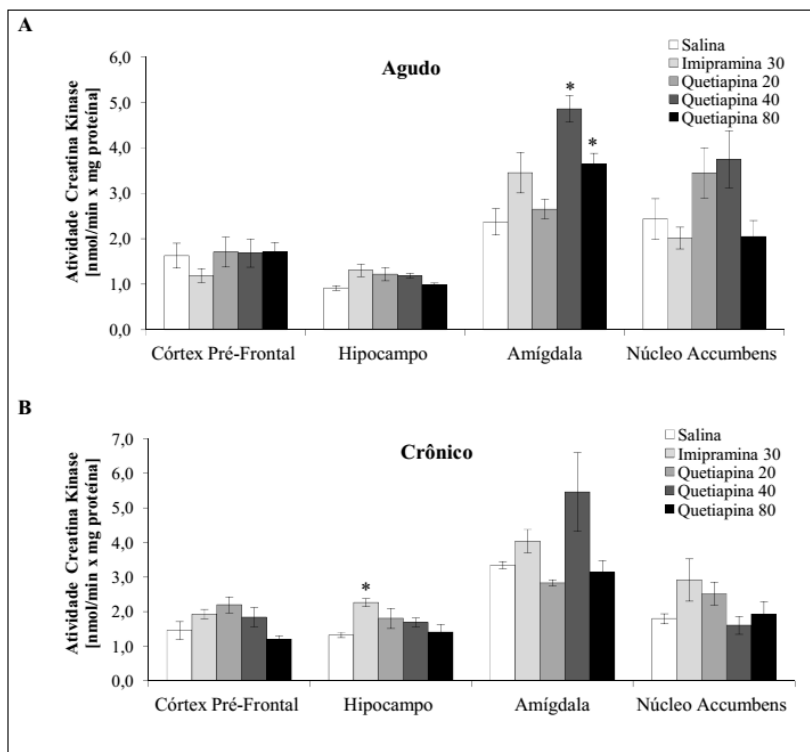
<0,05). Não houve alteração da atividade do complexo IV nas demais regiões analisadas. Após o tratamento crônico, a atividade do complexo IV não mostrou alteração em qualquer uma das estruturas cerebrais analisadas.



**Figura 5.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20, 40 e 80 mg/kg) sobre a atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial. A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ . (A) administração aguda; (B) administração crônica.

#### 4.2 ATIVIDADE DA ENZIMA CREATINA QUINASE - CK

Os resultados da atividade da enzima CK estão representados na figura 6. Os tratamentos agudo e crônico estão representados nas figuras 6A e 6B, respectivamente. A atividade enzimática de CK aumentou na amígdala, após tratamento agudo com a quetiapina nas doses de 40 e 80 mg/kg (Figura 6A;  $F = 10,45$ ;  $p < 0,05$ ). Nas demais estruturas de animais submetidos a tratamentos agudos não ocorreu variação da atividade CK. Sob o tratamento crônico com quetiapina, a atividade da CK não mostrou alteração em qualquer das estruturas observadas.



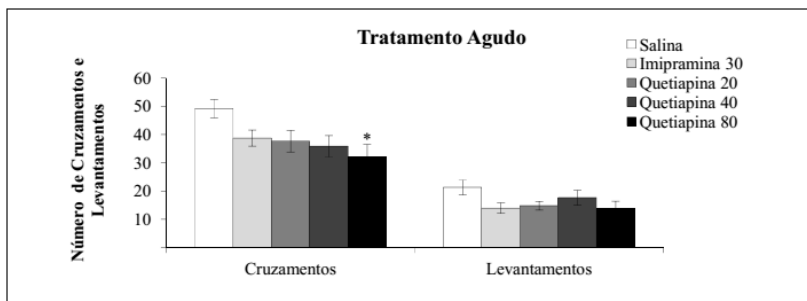
**Figura 6.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20, 40 e 80 mg/kg) sobre a atividade da enzima creatina quinase (CK). A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ . (A) administração aguda; (B) administração crônica.

#### 4.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM QUETIAPINA SOBRE A ATIVIDADE NO CAMPO ABERTO

Os efeitos do tratamento agudo com as doses de 20, 40 e 80 mg/kg de quetiapina sobre a atividade locomotora e exploratória no campo aberto estão ilustrados na figura 7. Somente os animais tratados com quetiapina na dose de 80 mg/kg apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos no campo aberto (Figura 7;  $F = 3.018$ ;  $p < 0,05$ ). Quanto ao número de levantamentos a análise estatística não revelou diferença significativa entre os tratamentos.

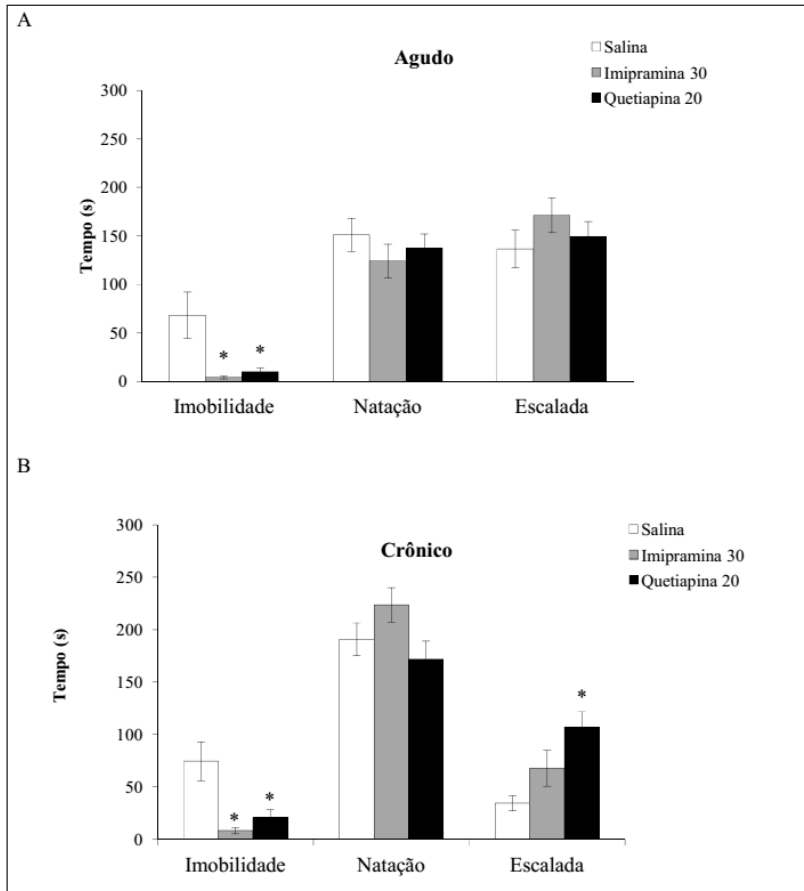
#### 4.4 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM QUETIAPINA NOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS AVALIADOS NO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA

Os efeitos do tratamento com quetiapina (20 mg/kg) nos parâmetros avaliados no teste de natação forçada estão ilustrados na figura 8. A figura 8A expressa os efeitos do tratamento agudo e a figura 8B ilustra os efeitos do tratamento crônico. Após o tratamento agudo, tanto os animais tratados com quetiapina, quanto os animais tratados com imipramina apresentaram redução significativa do tempo de imobilidade no teste (Figura 8A;  $F = 8,30$ ;  $p < 0,01$ ). Nos tempos de natação e escalada não houve diferença significativa entre os tratamentos agudos. Após o tratamento crônico por 14 dias, o tempo de imobilidade foi significativamente reduzido, tanto após tratamento com quetiapina, quanto com imipramina (Figura 8B;  $F = 8,44$ ;  $p < 0,01$ ). A quetiapina administrada cronicamente também induziu um efeito no tempo de escalada, aumentando significativamente o tempo de escalada, quando comparado com o grupo tratado com salina (Figura 8B;  $F = 7,48$ ;  $p < 0,01$ ).



**Figura 7.** Efeitos agudo da quetiapina (20, 40 e 80 mg/kg) sobre a atividade motora e exploratória dos animais testados no campo aberto. A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) do número de cruzamentos e levantamentos.

\* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ .



**Figura 8.** Efeitos agudo e crônico (14 dias) da quetiapina (20 mg/kg) sobre os parâmetros de mobilidade no teste de natação forçada. A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) do tempo. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ . (A) administração aguda; (B) administração crônica.

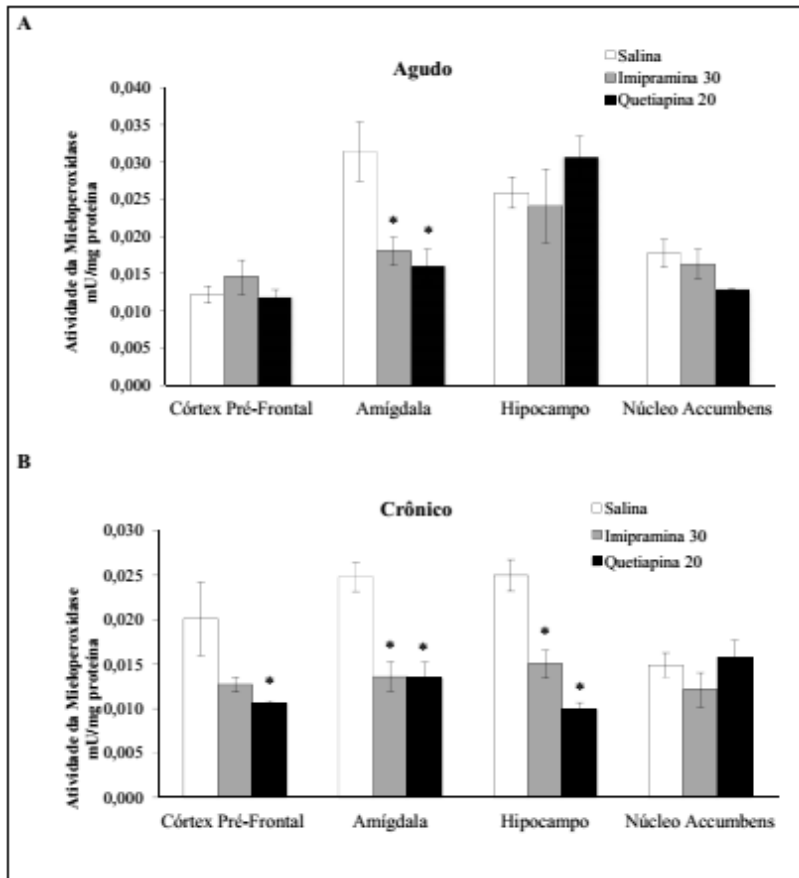
## 4.5 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO E CRÔNICO COM QUETIAPINA SOBRE PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.5.1 Atividade da enzima mieloperoxidase - MPO

Os resultados da atividade da enzima MPO estão representados na figura 9. Os tratamentos agudo e crônico estão representados nas figuras 9A e 9B, respectivamente. A atividade enzimática da MPO reduziu na amígdala, após tratamento agudo com imipramina (30 mg/kg) e quetiapina (20 mg/kg) (Figura 9A;  $F = 9,28$ ;  $p < 0,01$ ). Nas demais estruturas de animais submetidos a tratamentos agudos não ocorreu diferença significativa na atividade enzimática da MPO. Sob o tratamento crônico, a atividade da MPO reduziu significativamente no córtex pré-frontal de animais tratados com quetiapina (Figura 9B;  $F = 4,26$ ;  $p < 0,05$ ), amígdala de animais tratados com quetiapina e imipramina (Figura 9B;  $F = 14,79$ ;  $p < 0,001$ ) e hipocampo após tratamento com quetiapina e imipramina (Figura 9B;  $F = 28,23$ ;  $p < 0,0001$ ). No núcleo accumbens não ocorreu alteração significativa da atividade enzimática em qualquer dos tratamentos crônicos.

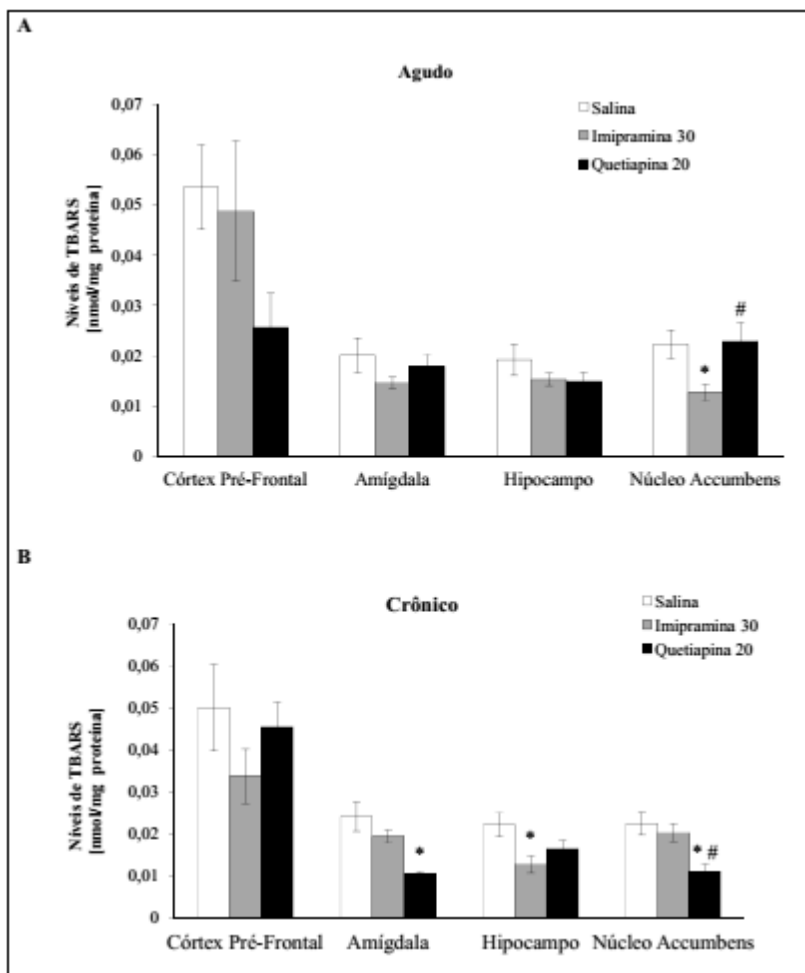
### 4.5.2 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS

A figura 10 representa as médias dos resultados da formação de TBARS. Os tratamentos agudo e crônico estão representados nas figuras 10A e 10B, respectivamente. Os níveis de TBARS apresentaram redução significativa nos animais tratados agudamente com imipramina (Figura 10A;  $F = 4,81$ ;  $p < 0,05$ ). Nas demais estruturas não ocorreu diferença significativa dos níveis de TBARS entre os tratamentos agudos. Nos animais submetidos ao tratamento crônico com quetiapina, os níveis de TBARS reduziram significativamente na amígdala (Figura 10B;  $F = 9,58$ ;  $p < 0,01$ ) e núcleo accumbens (Figura 10B;  $F = 7,67$ ;  $p < 0,01$ ). Os níveis de TBARS também reduziram no hipocampo de animais tratados cronicamente com imipramina (Figura 10B;  $F = 3,96$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20 mg/kg) sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ ; # Diferente do grupo imipramina. (A) administração aguda; (B) administração crônica.

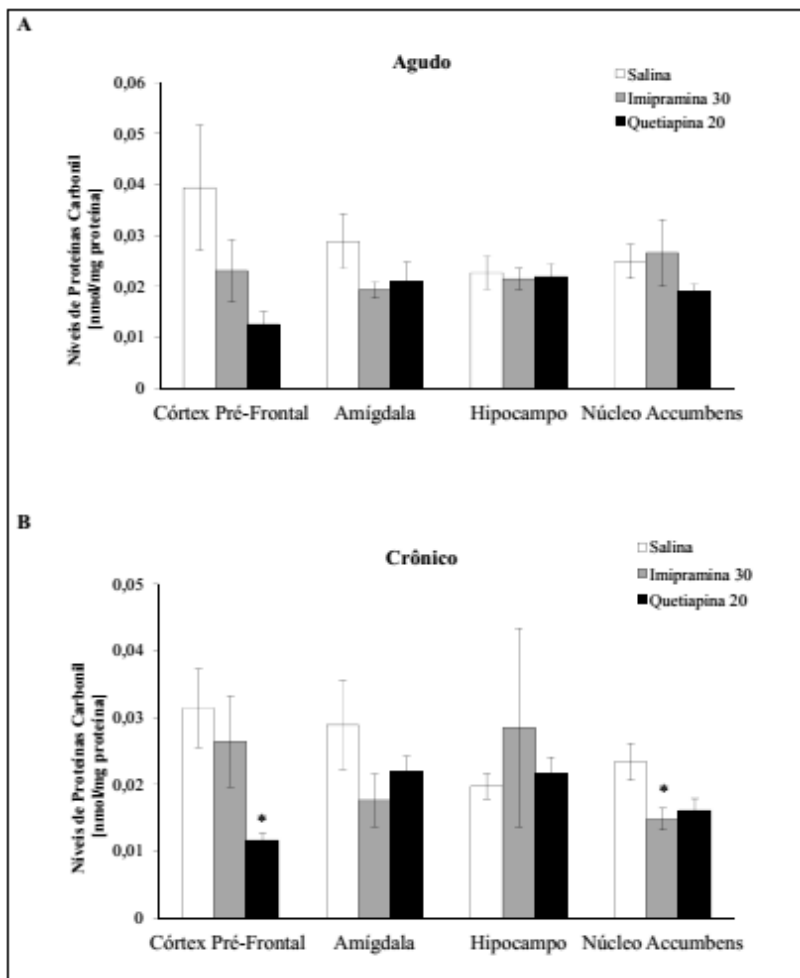




**Figura 10.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20 mg/kg) sobre os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ ; # Diferente do grupo imipramina. (A) administração aguda; (B) administração crônica

### 4.5.3 Formação de proteínas carbonil

As médias da formação de proteínas carboniladas estão representadas na figura 11. A figura 11A expressa os resultados sob tratamento agudo e a figura 11B expressa o tratamento crônico. O conteúdo de proteínas carboniladas não sofreu variação significativa entre os tratamentos agudos, em qualquer das estruturas cerebrais avaliadas. Nos animais submetidos aos tratamentos crônicos, o conteúdo de proteínas carboniladas reduziu significativamente no córtex pré-frontal de animais tratados com quetiapina (Figura 11B;  $F = 3,92$ ;  $p < 0,05$ ) e no núcleo accumbens de animais tratados cronicamente com imipramina (Figura 11B;  $F = 4,96$ ;  $p < 0,05$ ). Nas demais estruturas cerebrais não ocorreu variação do conteúdo carbonil entre os tratamentos.



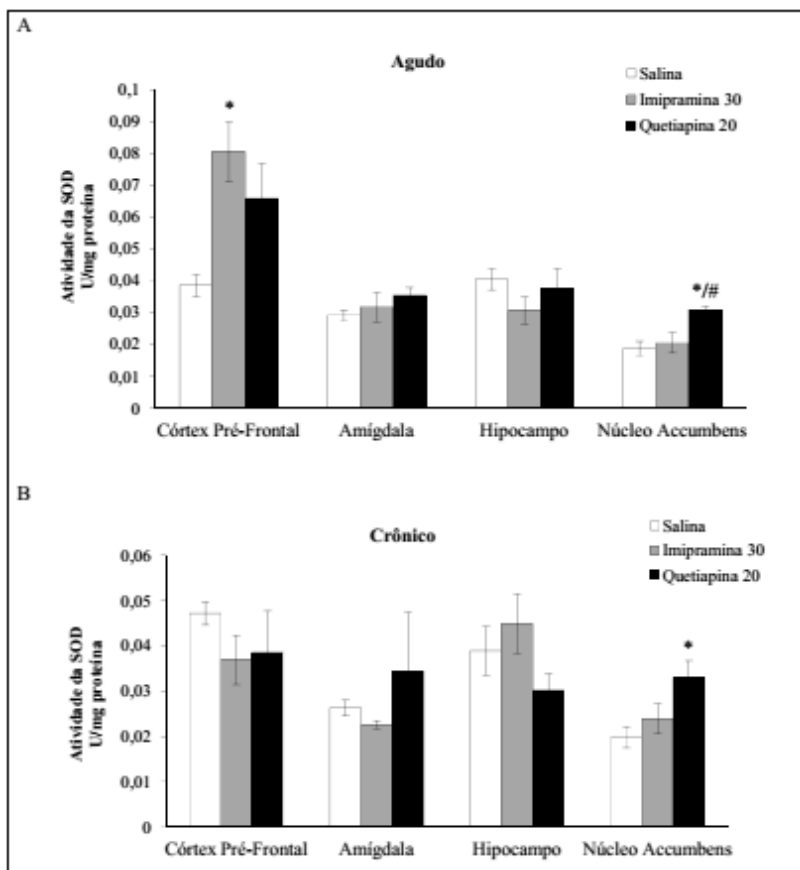
**Figura 11.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20 mg/kg) sobre os níveis de proteínas carbonil. A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ ; # Diferente do grupo imipramina. (A) administração aguda; (B) administração crônica.

#### **4.5.4 Atividade da enzima superóxido dismutase - SOD**

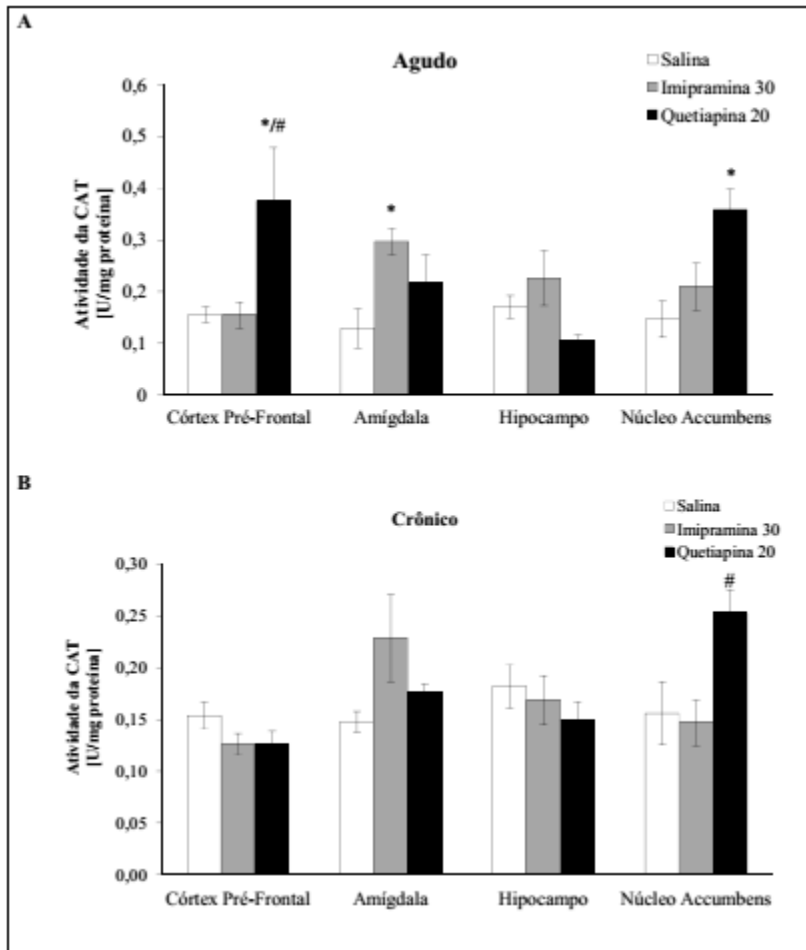
A atividade da enzima SOD está representada na figura 12. A figura 12A expressa os resultados do tratamento agudo e a figura 9B expressa o tratamento crônico. A atividade da SOD aumentou significativamente no córtex pré-frontal após tratamento agudo com imipramina (Figura 12A;  $F = 7,27$ ;  $p < 0,01$ ) e no núcleo accumbens após tratamento agudo com quetiapina (Figura 12A;  $F = 6,46$ ;  $p < 0,05$ ). No hipocampo e amígdala de animais tratados agudamente, não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos. Nos animais submetidos aos tratamentos crônicos, a atividade da SOD aumentou significativamente no núcleo accumbens de animais tratados com quetiapina (Figura 12B;  $F = 4,49$ ;  $p < 0,05$ ). Nas demais estruturas cerebrais não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos crônicos.

#### **4.5.5 Atividade da enzima catalase - CAT**

A atividade da enzima CAT está representada na figura 13. A figura 13A expressa os resultados sob tratamento agudo e a figura 13B expressa o tratamento crônico. Nos animais tratados agudamente com quetiapina, a atividade da CAT aumentou significativamente no córtex pré-frontal (Figura 13A;  $F = 5,15$ ;  $p < 0,05$ ) e no núcleo accumbens (Figura 13A;  $F = 7,37$ ;  $p < 0,01$ ). A atividade da CAT também aumentou significativamente na amígdala de animais sob tratamento agudo com imipramina (Figura 13A;  $F = 4,19$ ;  $p < 0,05$ ). Após o tratamento crônico com quetiapina a atividade da CAT aumentou no núcleo accumbens, mas o aumento somente alcançou resultado significativo quando comparado com os animais tratados com imipramina (Figura 13B;  $F = 4,56$ ;  $p < 0,05$ ). Nas demais estruturas cerebrais analisadas não ocorreu diferença significativa da atividade enzimática entre os tratamentos crônicos.



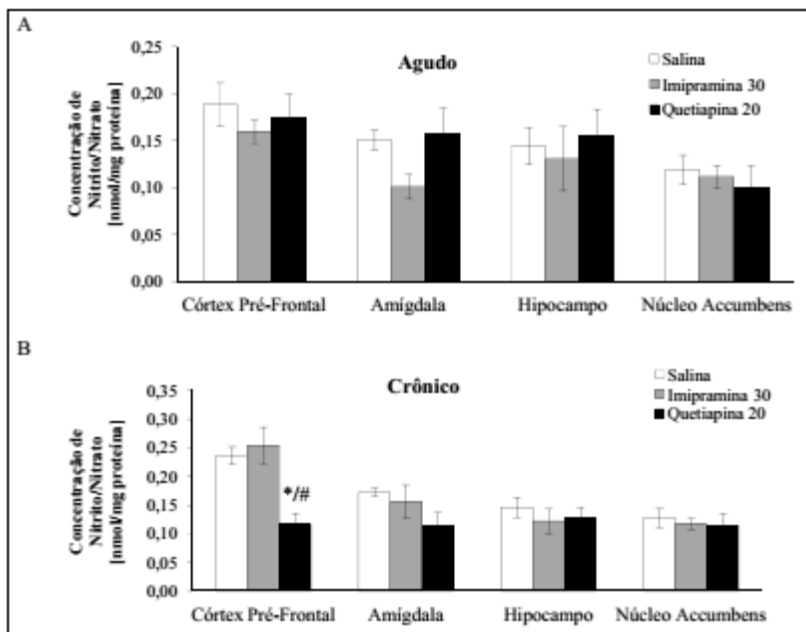
**Figura 12.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20 mg/kg) sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ ; # Diferente do grupo imipramina. (A) administração aguda; (B) administração crônica.



**Figura 13.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20 mg/kg) sobre a atividade da enzima catalase (CAT). A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da atividade enzimática. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ ; # Diferente do grupo imipramina. (A) administração aguda; (B) administração crônica.

#### 4.5.6 Medida da concentração de nitrito/nitrato

O resultado da concentração de nitrito/nitrato está representado na figura 14. A figura 14A representa os resultados sob tratamento agudo e a figura 14B representa o tratamento crônico. Nos animais tratados agudamente com quetiapina, não ocorreu variação significativa nas concentrações de nitrito/nitrato entre os tratamentos agudos em qualquer das estruturas cerebrais analisadas. Após o tratamento crônico com quetiapina, a concentração de nitrito/nitrato reduziu significativamente no córtex pré-frontal, tanto em relação ao grupo controle com salina, quanto em comparação ao grupo tratado com imipramina (Figura 14B;  $F = 10,21$ ;  $p < 0,01$ ).

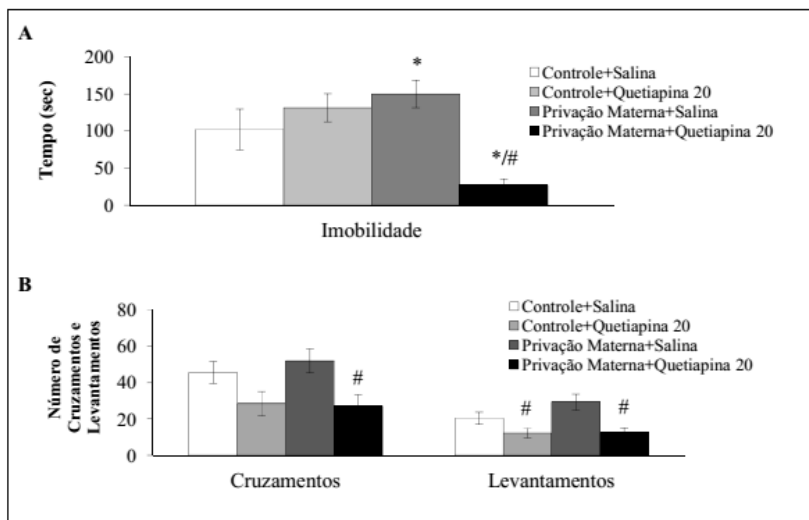


**Figura 14.** Efeitos agudo e crônico (administração por 14 dias) da quetiapina (20 mg/kg) sobre a concentração de nitrito/nitrato. A imipramina (30 mg/kg) foi usada como controle positivo. Média ( $\pm$  erro padrão da média) da concentração. \* Diferente de controle (salina),  $p < 0,05$ ; # Diferente do grupo imipramina. (A) administração aguda; (B) administração crônica.

#### 4.6 EFEITOS DO ESTRESSE DE PRIVAÇÃO MATERNA E TRATAMENTO COM QUETIAPINA NOS TESTES DE NATAÇÃO FORÇADA E ATIVIDADE LOCOMOTORA NO CAMPO ABERTO

Como representado na figura 15A, o comportamento depressivo na vida adulta dos animais, o qual foi induzido pelo estresse de privação materna pode ser observado pelo tempo de imobilidade dos animais no teste de natação forçada. O tempo de imobilidade foi significativamente reduzido em ratos tratados cronicamente com a quetiapina na dose de 20mg/kg (Figura 15A;  $F = 5,57$ ;  $p < 0,003$ ). A Figura 15B mostra os efeitos da privação materna e do tratamento com quetiapina sobre a atividade locomotora avaliada no teste do campo aberto. A atividade locomotora não foi diferente entre animais privados maternalmente (PM) e animais controles não privados (não PM), conforme medido pelo número de cruzamentos e de levantamentos pelos animais. Entretanto, a quetiapina reduziu a atividade locomotora em animais PM e em animais controles não PM, mas somente quando comparado a animais PM tratados com salina, conforme pode ser observado pelo número de cruzamentos (Figura 15B;  $F = 3,72$ ;  $p < 0,05$ ) e levantamentos (Figura 15B;  $F = 5,89$ ;  $p < 0,01$ ) no campo aberto.





**Figura 15.** Efeito da privação materna (PM), e do tratamento com quetiapina (20 mg/kg, durante 14 dias) sobre o tempo de imobilidade no teste de natação forçada (15A) e atividade locomotora (número de cruzamentos e levantamentos) no campo aberto (15B). Valores expressos como a média ( $\pm$  erro padrão da média).

\* Diferente de controle + salina,  $p < 0,05$ . # Diferente do PM + salina,  $p < 0,05$ .

#### 4.7 EFEITO DO ESTRESSE DE PRIVAÇÃO MATERNA E TRATAMENTO COM QUETIAPINA SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EPIGENÉTICOS

##### 4.7.1 Atividade de histonas desacetilases – HDAC

A figura 16A ilustra a influência do estresse de privação materna (PM) e tratamento crônico com quetiapina (20 mg/kg) sobre a atividade de HDACs. A análise estatística revelou que na idade adulta os ratos maternalmente privados (PM) apresentaram um aumento significativo na atividade de HDACs no hipocampo (Figura 16A;  $F = 11,11$ ,  $p < 0,001$ ) e no núcleo accumbens (Figura 16A;  $F = 13,81$ ,  $p < 0,001$ ), mas não apresentaram alteração da atividade enzimática no córtex pré-frontal (Figura 16A;  $F = 1,61$ ;  $P = 0,227$ ). O tratamento

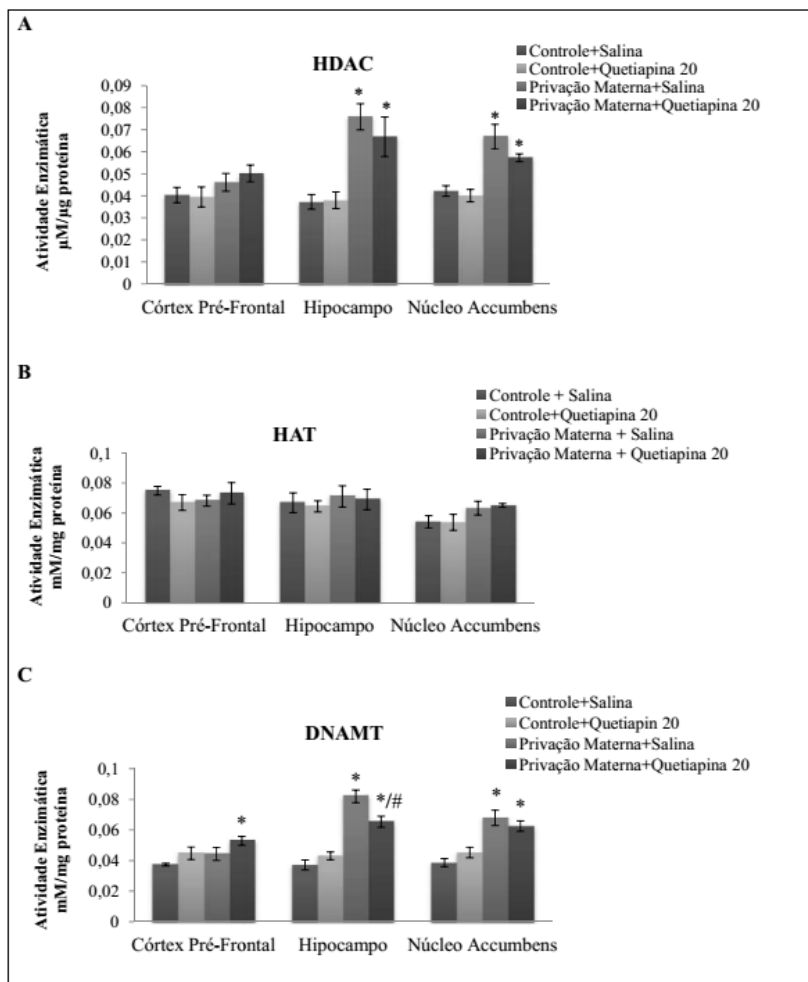
crônico com quetiapina não reduziu significativamente a atividade da HDAC no hipocampo e núcleo accumbens de animais PM.

#### **4.7.2 Atividade de histonas acetiltransferases – HAT**

Como representado pela figura 16B, o estresse causado pela privação materna (PM) não induziu alteração da atividade da HAT em animais adultos. Da mesma forma, o tratamento crônico com quetiapina não causou qualquer alteração na atividade da HAT, seja em relação aos animais PM tratados com salina ou aos animais controles não privados (não PM). A análise estatística não revelou alterações significativas em nenhuma das áreas cerebrais estudadas: hipocampo (Figura16B;  $F = 0,22$ ;  $p = 0,88$ ), núcleo accumbens (Figura16B;  $F = 2,05$ ;  $p = 0,15$ ) e córtex pré-frontal (Figura16B;  $F = 0,58$ ;  $P = 0,63$ ).

#### **4.7.3 Atividade de DNA metiltransferases – DNAMT**

A Figura 16C mostra a influência da privação materna (PM) e tratamento crônico com quetiapina na atividade enzimática da DNAMT. A análise estatística revelou que a atividade da DNAMT aumentou no hipocampo de ratos adultos, os quais foram submetidos à PM. Animais submetidos à PM e tratados com quetiapina também mostraram um aumento na atividade de DNAMT hipocampal, quando comparados com animais não privados (não PM). No entanto, a quetiapina reduziu significativamente a atividade da DNAMT no hipocampo de animais PM, quando comparado com animais PM tratados com solução salina, indicando que a quetiapina tem um perfil farmacológico no sentido de reverter a metilação do DNA no hipocampo de animais submetidos ao estresse de privação materna (Figura 16C;  $F = 36,56$ ,  $p < 0,001$ ). No núcleo accumbens, a atividade da DNAMT aumentou significativamente nos animais PM, tanto nos animais tratados com salina, quanto no tratamento com quetiapina. (Figura 16C;  $F = 13,92$ ,  $p < 0,001$ ). O tratamento crônico com quetiapina não reduziu significativamente a atividade de DNAMT no núcleo accumbens de animais PM. No córtex pré-frontal, apenas os animais submetidos à PM e tratados com quetiapina apresentaram um aumento na atividade da DNAMT em comparação com animais não privados (não PM) e tratados com solução salina (Figura 16C;  $F = 3,62$ ;  $p < 0,05$ ). Os outros grupos não mostraram alterações significativas na atividade da enzima DNAMT no córtex pré-frontal.



**Figura 16.** Efeito da privação materna (PM), e do tratamento com quetiapina (20 mg/kg, durante 14 dias) sobre o a atividade das enzimas histonas desacetilases (HDAC) (16A), histonas acetiltransferases (HAT) (16B) e DNA metiltransferases (DNAMT) (16C). Valores expressos como a média ( $\pm$  erro padrão da média).

\* Diferente do controle + salina,  $p < 0,05$ . # Diferente do PM + salina,  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi investigada a atividade dos complexos I a IV da cadeia respiratória mitocondrial em diferentes regiões cerebrais e sob atividade de diferentes doses de quetiapina. Os resultados revelaram que a atividade do complexo I foi alterada de forma diferenciada, em relação à concentração, região cerebral e também de acordo com a forma de administração, aguda ou crônica. A atividade do complexo I é apontada em muitos trabalhos como sendo inibida por antipsicóticos típicos e atípicos (Burkhardt et al., 1993; Maurer e Möller, 1997; Ben-Shachar 2002; Casademont et al., 2007; Ji et al., 2009). Em um estudo *in vitro* com mitocôndrias do fígado de ratos, pesquisadores observaram que vários antipsicóticos típicos e atípicos, incluindo a quetiapina, inibiram a atividade do complexo I (Modica-Napolitano et al., 2003). Em outro estudo *in vitro*, pesquisadores observaram que os complexos I e II foram inibidos por antidepressivos clássicos, mas não sofreram alterações funcionais significativas sob a ação da olanzapina, um antipsicótico atípico (Hroudova e Fisar, 2012). Por outro lado, em um estudo *in vivo* com ratos, a olanzapina, administrada agudamente, aumentou a atividade do complexo I no córtex pré-frontal e estriado, mas não promoveu alteração no hipocampo e também não promoveu alteração em qualquer das estruturas estudadas, após administração por 2 horas ou 24 horas. Quando a atividade do complexo I foi avaliada após administração crônica por 90 dias de clozapina e risperidona, outros antipsicóticos atípicos, os autores verificaram que o complexo I foi inibido pela clozapina e risperidona no córtex pré-frontal e hipocampo e pela risperidona no estriado de camundongos, mas não foi inibido no mesencéfalo, por nenhum dos antipsicóticos atípicos avaliados (Balijepalli et al., 2001). Outros trabalhos mostraram que a clozapina administrada cronicamente por 28 dias não inibiu a atividade do complexo I no cérebro de ratos e aumentou a atividade do complexo IV no hipocampo e córtex-frontal de ratos (Prince et al., 1997). Neste trabalho, a imipramina e as menores doses de quetiapina administradas agudamente, inibiram a atividade do complexo I no córtex pré-frontal e núcleo accumbens. Porém, no hipocampo e amígdala, a atividade do complexo I foi aumentada pela quetiapina. Por outro lado, as duas maiores doses agudas que aumentaram a atividade do complexo I no hipocampo, quando administradas cronicamente, reduziram a atividade na mesma região, enquanto não promoveram qualquer alteração nas demais estruturas avaliadas. A quetiapina, como também outros

antipsicóticos atípicos parece funcionar como protetora de danos celulares induzidos por agentes inibidores do complexo I, conforme observado em uma pesquisa com células *in vitro* (Tan et al., 2007). Desta forma, é importante observar que, embora muitos trabalhos apontem os antipsicóticos atípicos como inibidores do complexo I, parecem existir diferenças relacionadas a vários aspectos importantes, como por exemplo, doses administradas, tratamentos agudos ou crônicos e, mais importante, os tecidos e regiões cerebrais avaliados. Com relação ao complexo II, a quetiapina administrada agudamente aumentou a atividade no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala, mas não promoveu alteração no núcleo accumbens. A administração crônica de quetiapina, na dose de 20 mg provocou um aumento da atividade do complexo II no hipocampo e uma redução da atividade no núcleo accumbens. A dose maior de quetiapina provocou uma redução da atividade no córtex pré-frontal.

A literatura não traz estudos acerca da função da quetiapina sobre a cadeia mitocondrial completa. No entanto, alguns trabalhos mostraram que outro antipsicótico atípico, a olanzapina, não alterou a função do complexo II em um estudo *in vitro* (Hroudova e Fisar, 2012) e aumentou a atividade do complexo II no músculo e fígado, em um estudo *in vivo* com ratos, após a administração crônica por 9 semanas (Zugno et al., 2012).

No presente estudo também foi avaliada a atividade da succinato: citocromo *c* oxidoreductase, complexos II-III. A quetiapina administrada agudamente aumentou a atividade no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala, nas doses de 20 e 40 mg. Após administração crônica, a quetiapina, na dose de 20 mg aumentou a atividade no córtex pré-frontal e hipocampo e, na dose de 40 mg, aumentou a atividade dos complexos II-III, na amígdala. Alguns autores mostraram que antipsicóticos típicos e atípicos, como a clozapina, somente inibiram a atividade da succinato: cytochrome *c* oxidoreductase em córtex cerebral humano, a partir de doses elevadas, bem acima das doses de clozapina que inibiram o complexo I, mostrando que os antipsicóticos atípicos parecem exercer efeito menos prejudicial sobre os complexos II-III da cadeia mitocondrial (Maurer e Moller, 1997).

Neste estudo, a dose aguda de 40 mg aumentou a atividade do complexo IV na amígdala. Nas demais regiões e também sob tratamento crônico, a quetiapina não induziu qualquer alteração na atividade do complexo IV. Um trabalho avaliando a função do antipsicótico atípico

clozapina verificou que a administração crônica por 28 dias aumentou a atividade do complexo IV no hipocampo e córtex frontal de ratos (Prince et al., 1997). Entretanto, outro trabalho não verificou qualquer alteração da atividade do complexo IV, tanto no córtex pré-frontal, quando no hipocampo e outras áreas cerebrais estudadas, a partir da administração crônica de clozapina e outros antipsicóticos atípicos (Streck et al., 2007). Portanto, parece que a quetiapina, a exemplo de outros antipsicóticos atípicos não exerce grandes influências na função do complexo IV da cadeia respiratória, pelo menos nas regiões cerebrais estudadas. Com relação ao aumento da atividade do complexo IV na amígdala, mais estudos são necessários, tendo em vista ser uma região importante do sistema límbico, envolvida em transtornos de humor (Murray et al., 2011).

Como a quetiapina reduz os danos provocados por inibidores da cadeia respiratória (Tan et al., 2007) e no presente estudo mostrou um aumento na atividade dos complex I no hipocampo e II e II-III, no hipocampo e córtex pré-frontal, parece razoável pensar que a quetiapina pode estar reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), um processo que pode estar aumentado em situações de estresse e depressão e, desta forma, atuando como protetor de danos da cadeia respiratória. A inibição dos complexos I, III e IV cerebrais aumenta a formação de EROS (Adam-Vizi, 2005; Rizzardini et al., 2006) e o aumento de EROS leva a neurodegeneração (Rizzardini et al., 2006). O aumento de EROS está fortemente relacionado à depressão (Black et al., 2015) e pode levar a prejuízos na produção de neurotransmissores monoaminérgicos (Manji et al., 2012). Estudos com animais também mostraram que o estresse crônico induziu aumento na produção de EROS no córtex pré-frontal e hipocampo (Lucca et al., 2009a) e aumento da peroxidação de proteínas, juntamente com uma redução de defesas antioxidantes nas mesmas regiões (Lucca et al., 2009b). Portanto, a quetiapina pode estar atuando em regiões que, possivelmente são mais susceptíveis a prejuízos neuronais e alterações psiquiátricas, quando os indivíduos são submetidos a condições de estresse. O córtex pré-frontal e hipocampo são duas regiões cerebrais vulneráveis a condições de estresse, quando podem ter, entre outros prejuízos, inibição de complexos da cadeia respiratória (Della et al., 2012). A quetiapina reverteu a redução da neurogênese hipocampal provocada por estresse em animais (Luo et al., 2005), um mecanismo fisiopatológico que também está associado a depressão e outros

transtornos psiquiátricos e que tem relação com disfunção do metabolismo energético da cadeia mitocondrial (Gardner et al., 2003; Mattson et al., 2008).

Com relação à CK, uma enzima importante em tecidos com alta demanda de energia (Bessman e Carpenter, 1985), a quetiapina promoveu um aumento da atividade somente na amígdala, nas doses agudas de 40 e 80 mg/kg. Nas demais estruturas cerebrais avaliadas, e também a partir do tratamento crônico, a quetiapina não exerceu alteração da atividade da CK. Um estudo mostrou que a atividade da CK aumentou no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos, após tratamento crônico com o antidepressivo paroxetina. Entretanto, os antidepressivos venlafaxina e nortriptilina não exerceram influência na atividade de CK, nas mesmas regiões cerebrais. Os autores também discutem que a função da paroxetina na atividade da CK parece ocorrer indiretamente, através de outros mecanismos, tendo em vista que o fármaco não promoveu alteração, quando observado *in vitro* diretamente sobre as mesmas estruturas (Santos et al., 2009). A paroxetina aumentou os níveis de CK no plasma de uma paciente com depressão (Yenilmez et al., 2014). Portanto, o aumento da atividade da CK promovido pela paroxetina pode estar relacionado ao aumento dos níveis da enzima. Outro estudo mostrou que a fluvoxamina administrada cronicamente aumentou a atividade da CK no estriado e cerebelo, mas não exerceu qualquer alteração no hipocampo e córtex pré-frontal (Ferreira et al., 2014). Diferentemente de outros estudos com antidepressivos, a fluoxetina inibiu a atividade da CK no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, enquanto a olanzapina, um antipsicótico atípico, inibiu a atividade da CK no córtex pré-frontal e cerebelo, mas não exerceu efeito no hipocampo e estriado de ratos (Agostinho et al., 2009). Um estudo mostrou que vários antipsicóticos atípicos, não incluindo a quetiapina, provocaram um grande aumento da atividade da CK no plasma de pacientes com transtornos psiquiátricos. Em alguns pacientes, mas não em todos, a atividade da CK voltou ao normal após continuidade dos tratamentos com antipsicóticos, sugerindo que alguns mecanismos endógenos promoveram uma compensação ou limitação da atividade (Meltzer et al., 1996). Os mesmos autores também mostraram que os mecanismos fisiopatológicos da síndrome neuroléptica maligna, os quais podem estar paralelos ou subjacentes ao aumento da CK, não estavam presentes. Desta forma pode-se fazer a seguinte questão: o aumento nos níveis ou atividade CK, a partir dos antipsicóticos pode ser

um efeito colateral tóxico ou contribuir para melhorar as atividades celulares? Outros estudos mostraram que os níveis plasmáticos de CK foram elevados após tratamento com quetiapina e outros antipsicóticos atípicos (Boot e de Haan, 2000; Klein et al., 2006). No entanto, existem poucos estudos mostrando a função de antipsicóticos atípicos na atividade da CK em estruturas cerebrais e, portanto, ainda não é possível relacionar ou extrapolar sobre a ação da quetiapina ou outro antipsicótico nos níveis e atividade CK no plasma com ou para as estruturas cerebrais. Um estudo avaliando o efeito de antipsicóticos atípicos em estruturas cerebrais verificou resultados diferentes entre diferentes drogas e estruturas avaliadas. A olanzapina e a clozapina reduziram a atividade da CK no cerebelo e córtex frontal, mas aumentaram no estriado (Assis et al., 2007).

Os dados deste estudo, juntamente com os dados da literatura sobre a quetiapina e outros antipsicóticos atípicos indicam a existência de mecanismos complexos e ainda não compreendidos com relação à função dos antipsicóticos atípicos sobre os mecanismos enzimáticos da cadeia respiratória. Entretanto, os resultados do presente estudo, sugerem que a quetiapina promove de uma forma geral, um aumento da atividade dos complexos da cadeia respiratória, um mecanismo do metabolismo energético mitocondrial que parece subjacente a funções positivas contra danos neuronais e alterações psiquiátricas.

Conforme descrito na literatura, a quetiapina promove efeito sedativo (Todder et al., 2006; Cha e McIntyre, 2012). Portanto, um dos objetivos deste estudo foi verificar se o tratamento agudo com quetiapina, poderia apresentar alteração nos parâmetros de atividade locomotora e exploratória no campo aberto. Os resultados deste estudo mostraram que somente a dose de 80 mg/kg provocou uma redução significativa, quando comparada com os animais tratados com salina. Quanto à atividade exploratória avaliada através dos levantamentos no campo aberto, não houve diferença entre os tratamentos. Os resultados do tratamento agudo sugerem que as doses menores não são capazes de provocar grandes alterações na atividade locomotora.

Conforme descrito na metodologia, a partir dos resultados da atividade locomotora no campo aberto após tratamento agudo com as doses de 20, 40 e 80 mg/kg de quetiapina, optou-se por analisar o efeito da concentração de 20 mg/kg sobre os parâmetros comportamentais no teste de natação forçada, bem como sobre os demais parâmetros bioquímicos. Portanto, o objetivo desta etapa foi verificar o efeito do



tratamento agudo e crônico com quetiapina sobre parâmetros de mobilidade no teste de natação forçada, em animais que não foram submetidos a qualquer tipo de estresse. Os resultados mostraram que o tratamento agudo com quetiapina reduziu significativamente a imobilidade, um parâmetro clássico sensível ao efeito de fármacos que exercem efeito antidepressivo na clínica, embora seja uma característica ainda norteeda de questionamentos, pois o efeito terapêutico clínico só ocorre depois de tratamento crônico (Yan et al., 2010). Em um estudo com camundongos, os autores verificaram redução significativa no tempo de imobilidade de animais tratados agudamente com a norquetiapina, o principal metabólito ativo da quetiapina em humanos (Winter et al., 2008), porém, o tratamento com quetiapina não exerceu efeito significativo no tempo de imobilidade (Cross et al., 2016). Uma possível justificativa para a falta de resposta antidepressiva ao tratamento agudo neste último estudo talvez seja o fato de terem administrado uma concentração menor de quetiapina, em comparação ao presente trabalho, tendo em vista que a produção do metabólito N-desalquil quetiapina, o qual potencializa o efeito tipo antidepressivo da quetiapina, é menor em roedores experimentais (Cross et al., 2016). No presente estudo, o tratamento agudo não promoveu alteração significativa nos parâmetros de mobilidade, como o tempo de natação e escalada, quando comparado com o grupo controle tratado com salina. Por outro lado, o tratamento crônico com quetiapina reduziu significativamente o tempo de imobilidade e aumentou também de forma significativa o tempo de escalada. Não foram encontrados na literatura dados acerca do efeito crônico da quetiapina em ratos, sobre os parâmetros avaliados no teste de natação forçada, sem que os animais sejam submetidos previamente a protocolos de estresse. Entretanto, em animais submetidos a estresse crônico, a quetiapina é apontada como um fármaco que causa alteração dos parâmetros no teste de natação forçada, traduzindo-se em redução dos efeitos depressivos causados pelo estresse (Elmelegy e Kamal, 2013).

Um dos mecanismos de ação importantes da quetiapina é o bloqueio do transportador de noradrenalina, o qual também é apontado como um dos mecanismos envolvidos na sua ação antidepressiva (Baune et al., 2008). O bloqueio do transportador de noradrenalina aumenta a disponibilidade de noradrenalina na fenda sináptica e, portanto, a sua ação pós sináptica. Outro mecanismo importante da quetiapina e seu metabólito norquetiapina é o bloqueio de

autoreceptores  $\alpha_2$  adrenérgico em corpos celulares, cuja função é o controle de liberação de noradrenalina por *feedback* negativo. Portanto, a ação bloqueadora da quetiapina sobre esses receptores aumenta a transmissão noradrenérgica neuronal (Chernoloz et al., 2012). No presente estudo a quetiapina administrada cronicamente aumentou o tempo de escalada. O tempo de escalada no teste de natação forçada é um parâmetro sensível a fármacos que aumentam a disponibilidade de noradrenalina (Detke et al., 1997). Portanto, o resultado da administração crônica de quetiapina sugere que sua ação em aumentar cronicamente a disponibilidade de noradrenalina foi um fator importante no potente efeito tipo antidepressivo, observado através dos efeitos da quetiapina nos parâmetros de imobilidade e escalada.

As estruturas cerebrais dos mesmos animais que foram avaliados no teste de natação forçada, foram submetidas à avaliação de parâmetros do estresse oxidativo, considerando que vários desses parâmetros são alterados em pacientes com depressão (Rawdin et al. 2013) e em animais submetidos a protocolos de estresse e depressão. Adicionalmente, fármacos clássicos (Rawdin et al., 2013) e novos (Réus et al., 2015b) com propriedades antidepressivas vêm sendo mostrados como tendo características antioxidantes. Assim, o objetivo desta etapa foi verificar o efeito do tratamento agudo e crônico da quetiapina, sobre alguns parâmetros bioquímicos oxidativos, nitrosativos e antioxidantes e, desta forma, avaliar sua possível ação positiva no balanço oxidativo.

A atividade da enzima MPO reduziu significativamente na amígdala após tratamento agudo, tanto de animais tratados com quetiapina, quando de animais tratados com imipramina. No tratamento crônico, a quetiapina reduziu a atividade da MPO no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala. No núcleo accumbens não ocorreu alteração da MPO, tanto no tratamento com quetiapina, quanto com imipramina. A enzima MPO está presente em neutrófilos, monócitos e células microgliais. É uma enzima envolvida na peroxidação lipídica e cataliza a formação de ácido hipocloroso (HOCl) a partir do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e cloreto (Spickett et al., 2000; Galecki et al., 2010). Além de EROS, a MPO induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais também estão envolvidas em doenças neurodegenerativas (Lefkowitz e Lefkowitz, 2008), um processo biológico que também está envolvido nos prejuízos da neurogênese hipocampal (Ekdahl et al., 2003). Além disso, os níveis de várias citocinas pró-inflamatórias são altos em pacientes com TDM (Dowlati et

al, 2010) e em indivíduos mais vulneráveis ao estresse e à TRD (Raison et al., 2013; Hoddes et al., 2014). Adicionalmente às citocinas pró-inflamatórias, estudos mostraram que maiores níveis de MPO foram correlacionados com depressão em humanos (Vacarino et al., 2008). Uma correlação positiva foi observada entre o polimorfismo de um único nucleotídeo na região promotora do gene que codifica a MPO e depressão recorrente em humanos. Os autores verificaram que a variante que aumenta a expressão de MPO foi mais associada à depressão (Galecki et al., 2010). Alguns estudos evidenciaram o efeito antioxidante da quetiapina no córtex pré-frontal e hipocampo, mostrando que o fármaco reduz a peroxidação lipídica nessas regiões, embora não tenham mostrado seu efeito específico na atividade da MPO (Han et al., 2015; Xuan et al., 2015). Portanto, a redução da atividade da MPO no córtex pré-frontal e hipocampo, após tratamento crônico, e na amígdala, após tratamento agudo, sugere uma relevante função protetora da quetiapina nas estruturas cerebrais envolvidas com depressão e outros transtornos psiquiátricos. É importante também mencionar que a MPO gera proteínas carbonílicas (Yan et al., 1997) e espécies reativas de nitrogênio (Byun et al., 1999). Portanto, o efeito da quetiapina reduzindo a atividade da MPO pode relevantemente e positivamente modular o balanço oxidativo e nitrosativo.

As TBARS constituem os principais marcadores biológicos da peroxidação lipídica de membranas celulares (Czerska et al., 2015). A oxidação de lipídeos de membrana pode levar a vários prejuízos na função, até a ruptura e morte celular (Ho et al., 2013). Aumento nos níveis de TBARS vem sendo observado no plasma de pacientes com depressão recorrente (Stefanescu e Ciobica, 2012) e em regiões cerebrais de animais submetidos a estresse de privação materna (Réus et al., 2015b).

Com relação ao tratamento agudo, embora a quetiapina tenha promovido uma redução de TBARS no córtex pré-frontal, este efeito não chegou a um nível estatisticamente significativo. Após tratamento crônico, a quetiapina reduziu os níveis de TBARS na amígdala e núcleo accumbens. Outros estudos evidenciaram o efeito antioxidante da quetiapina sobre a peroxidação lipídica no córtex pré-frontal e hipocampo (Han et al., 2015; Xuan et al., 2015). No presente estudo a quetiapina não promoveu alteração nos marcadores de peroxidação lipídica no córtex pré-frontal e hipocampo. Entretanto, nestas regiões, é importante observar que os últimos autores induziram o aumento do

estresse oxidativo, e, portanto, a ação da quetiapina foi sobre níveis aumentados de peroxidação lipídica e não sobre níveis supostamente basais como no presente estudo. O efeito antioxidante da quetiapina sobre os níveis de TBARS também foi observado em plasma humano (Dietrich-Muszalska et al., 2011). Considerando que os marcadores de peroxidação lipídica se apresentam aumentados no plasma de pacientes com depressão e em regiões cerebrais de animais submetidos a estresse, a função antioxidante sobre a peroxidação lipídica em regiões cerebrais envolvidas com transtornos de humor é mais um fator positivo da quetiapina no tratamento da depressão.

Após o tratamento agudo com quetiapina ou imipramina, não ocorreu alteração na formação de proteínas carboniladas, em qualquer das regiões cerebrais analisadas, embora tenha havido uma tendência na redução do conteúdo carbonil no córtex pré-frontal de animais tratados agudamente com quetiapina. A partir do tratamento crônico, o conteúdo de proteínas carboniladas reduziu significativamente no córtex pré-frontal de animais tratados com quetiapina e no núcleo accumbens de animais tratados com imipramina. Nas demais regiões e tratamentos analisados não ocorreu qualquer alteração do conteúdo carbonil.

A carbonilação é um tipo de oxidação de proteínas que pode ser induzido por espécies reativas de oxigênio. A oxidação de cadeias laterais de alguns aminoácidos forma cetonas ou aldeídos reativos, os quais podem reagir com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), para formar hidrazonas. Uma variedade de espécies carbonil deriva de reações de cadeias a partir de ácidos graxos poliinsaturados (Suzuki et al., 2010).

Este foi o primeiro estudo a investigar o conteúdo de proteínas carboniladas em regiões cerebrais de animais tratados com quetiapina. Um estudo que investigou outros antipsicóticos atípicos observou que a clozapina aumentou o conteúdo de proteínas carboniladas no hipocampo, mas não induziu qualquer alteração no córtex pré-frontal, estriado e córtex cerebral de ratos tratados cronicamente por 28 dias (Martins et al., 2008). No presente estudo, além de não alterar o conteúdo de proteínas carboniladas no hipocampo, núcleo accumbens e amígdala, a quetiapina administrada cronicamente reduziu os níveis no córtex pré-frontal, sugerindo uma função protetora da quetiapina sobre danos a proteínas nesta região.

A atividade da enzima antioxidante SOD parece ser um dos mecanismos traços envolvidos na depressão, sendo que sua atividade é reduzida no soro de pacientes com TDM e transtorno do humor bipolar

(Talarowska et al., 2015) e em regiões cerebrais de animais submetidos a estresse de privação materna (Réus et al., 2015b) e estresse crônico na vida adulta (Liu et al., 2015). Um fator importante é que a SOD é a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo, convertendo radical superóxido a peróxido de hidrogênio, o qual é convertido a água e oxigênio, pelas enzimas CAT e glutathione peroxidase (Padurariu et al., 2010). Portanto, um dos propósitos do presente estudo foi avaliar a atividade da SOD em regiões cerebrais de animais tratados agudamente e cronicamente com a quetiapina. A atividade da SOD aumentou significativamente no núcleo accumbens de animais tratados agudamente com quetiapina e no córtex pré-frontal de animais tratados com imipramina. Nas demais regiões cerebrais e tratamentos agudos não houve alteração significativa da atividade da SOD, quando comparado com sua atividade basal em animais tratados com salina. Após tratamento crônico, a atividade da SOD aumentou significativamente no núcleo accumbens de animais tratados com quetiapina. Nas demais regiões e tratamentos crônicos não ocorreu alteração da atividade da SOD. Existem poucos trabalhos relatando o efeito da quetiapina sobre a atividade da SOD em regiões cerebrais. Nos estudos de Xuan et al. (2015), os autores não observaram efeito da quetiapina sobre a atividade da SOD em regiões cerebrais, embora tenham observado um importante efeito antioxidante sobre outros parâmetros do estresse oxidativo. A quetiapina aumentou significativamente a atividade da SOD no soro de pacientes com esquizofrenia (Padurariu et al., 2010). Em outro estudo, a quetiapina reverteu um aumento da atividade da SOD induzida por etanol no hipocampo de ratos. Por outro lado, no cerebelo a quetiapina aumentou a atividade da SOD, a qual foi reduzida por etanol. Entretanto, em outros parâmetros oxidativos a quetiapina exerceu efeito protetor sobre as alterações induzidas pelo etanol no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de ratos. Os autores argumentam que um possível efeito da quetiapina no hipocampo foi no sentido de normalizar um aumento compensatório da atividade da SOD sobre o estresse oxidativo induzido por etanol (Han et al., 2015). Um estudo, o qual avaliou o efeito de outros antipsicóticos atípicos sobre a atividade da SOD em cérebro de ratos, observou que, diferentemente dos antipsicóticos típicos, os atípicos não promovem redução na atividade, como também na expressão da SOD no cérebro dos animais (Parikh et al., 2003). Os antipsicóticos atípicos de uma forma geral parecem exercer efeito antioxidante, diferentemente dos antipsicóticos típicos. Entretanto, os

mecanismos envolvidos no efeito protetor sobre o balanço oxidativo ainda carecem de estudos (Lee et al., 2013). No presente estudo, a quetiapina tanto agudamente quanto cronicamente aumentou a atividade da SOD no núcleo accumbens. Embora alguns tratamentos pareçam induzir alteração da SOD de forma compensatória a um aumento de outros parâmetros oxidativos, a ação da quetiapina no presente estudo parece mais relacionada a um efeito protetor diretamente na atividade da SOD, tendo em vista que a quetiapina reduziu a maioria dos marcadores relacionados a um possível estresse oxidativo no núcleo accumbens.

A atividade da CAT aumentou no córtex pré-frontal e núcleo accumbens de animais tratados agudamente com quetiapina e na amígdala sob o tratamento agudo com imipramina. Após tratamento crônico, a atividade da CAT aumentou no núcleo accumbens de animais tratados com quetiapina. Nas demais regiões e tratamentos crônicos não ocorreu qualquer alteração na atividade da CAT. A enzima CAT desempenha uma função importante em converter o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (Padurariu et al., 2010), desempenhando desta forma um trabalho de complementação da enzima SOD na defesa antioxidante enzimática. Vários estudos vêm mostrando que em animais submetidos a estresse crônico a atividade da CAT é reduzida em regiões cerebrais subjacentes à modulação do humor, tais como o córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo accumbens (Che et al., 2015; Liu et al., 2015; Ortmann et al., 2016). Nestes últimos estudos, a redução da atividade da CAT foi paralela a um aumento de comportamentos anedônicos e semelhantes à depressão, bem como de vários parâmetros indicando aumento de estresse oxidativo. Mais importante é o fato de que substratos de plantas com propriedades antioxidantes revertem o comportamento depressivo e restauram o balanço oxidativo, incluindo o aumento da atividade da CAT (Liu et al., 2015; Ortmann et al., 2016). Embora ainda escassos os estudos, a quetiapina vêm sendo apontada por apresentar função antioxidante, tanto na redução de espécies reativas, quanto na melhora do desempenho de atividades antioxidantes enzimáticas. Um estudo mostrou que a quetiapina reverteu a redução da atividade da CAT no córtex pré-frontal de animais tratados cronicamente com etanol (Han et al., 2015). Os resultados destes últimos e do presente estudo mostraram que a quetiapina parece interferir de forma positiva na atividade da CAT no cérebro, pelo menos no córtex pré-frontal e núcleo accumbens. No entanto, também é importante destacar que, além de aumentar a atividade antioxidante

basal no córtex pré-frontal e núcleo accumbens, a quetiapina não induziu redução da atividade enzimática basal da CAT no hipocampo e amígdala, um dos efeitos positivos dos antipsicóticos atípicos, em detrimento dos antipsicóticos típicos (Parikh et al., 2003; Lee et al., 2013).

O tratamento agudo com quetiapina não induziu alteração sobre a concentração de nitrito/nitrato em qualquer das regiões cerebrais avaliadas. Após tratamento crônico, a quetiapina reduziu significativamente a concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal. Nas demais regiões e tratamentos não houve alteração da concentração de nitrito/nitrato, em comparação ao tratamento com salina. O aumento nas concentrações de nitrito e nitrato é um dos parâmetros que refletem o conteúdo de óxido nítrico e o estresse nitrosativo. A produção elevada de óxido nítrico pode reagir com superóxido e formar o peroxinitrito, um ânion com forte propriedade oxidativa (Calabrese et al., 2007). Estudos têm mostrado que a superprodução de espécies reativas de nitrogênio resulta em processos oxidativos e inflamatórios, culminando em neurotoxicidade (Sayre et al., 2008). A depressão também vem associada com níveis aumentados de óxido nítrico e nitrato (Maes et al., 2009). Em animais submetidos a estresse crônico, o aumento de óxido nítrico, a partir da enzima óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) exerceu efeito negativo sobre a neurogênese hipocampal e parece ser, pelo menos parcialmente, responsável pelo efeito depressivo nos animais (Zhou et al., 2007). Além disso, inibidores da NOS exerceram efeitos semelhantes a antidepressivos em animais submetidos a estresse e protocolos de depressão (Zhou et al., 2007; Dhir e Kulkarni, 2007; Zhang et al., 2013; Tomaz et al., 2014). Alguns autores observaram uma associação entre polimorfismos dos genes que codificam as enzimas óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e induzida (iNOS) em pacientes com depressão, mostrando que as variantes relacionadas a um aumento da atividade transcricional foram correlacionadas positivamente com depressão recorrente (Galecki et al., 2011). Os dados do presente estudo revelaram que a quetiapina, administrada cronicamente reduziu as concentrações de nitrito e nitrato no córtex pré-frontal e não promoveu qualquer alteração nas demais regiões avaliadas, bem como no tratamento agudo, sugerindo uma função benéfica sobre alguns parâmetros do estresse nitrosativo no cérebro. Corroborando alguns dados da literatura sobre estresse oxidativo, o presente estudo aponta que a quetiapina apresenta um perfil antioxidante (Padurariu et al., 2010;

Dietrich-Muszalska et al, 2011; Han et al., 2015; Xuan et al., 2015). É sugerido que o mecanismo antioxidante da quetiapina contribui para a baixa incidência de efeitos extrapiramidais e prejuízos nos movimentos, causados principalmente pelos antipsicóticos típicos. Além disso, o perfil antioxidante de antipsicóticos atípicos parece importante no tratamento da discinesia tardia causada por antipsicóticos típicos (Sacchetti e Valsecchi, 2003; Falkai et al., 2005). Mais especificamente sobre a quetiapina, estudos também sugeriram sua função sobre a remissão da discinesia tardia causada por antipsicóticos típicos (Vesely et al., 2000). Contudo, este é o primeiro trabalho a avaliar o efeito da quetiapina sobre um conjunto maior de parâmetros acerca do estresse oxidativo, bem como o primeiro a avaliar marcadores específicos do estresse nitrosativo. Portanto, mais estudos acerca da função da quetiapina nos marcadores nitrosativos e oxidativos, juntamente com parâmetros comportamentais, podem trazer mais evidências sobre o seu suposto papel antioxidante e a possível correlação com efeitos antidepressivos.

Após avaliar o efeito do tratamento agudo e crônico com quetiapina sobre a atividade da CRM e parâmetros do estresse oxidativo, bem como seu efeito no comportamento tipo depressivo no teste de natação forçada, o presente estudo avaliou o efeito da quetiapina no comportamento e parâmetros epigenéticos de animais submetidos a estresse de privação materna. O objetivo nesta fase do estudo foi investigar os efeitos da quetiapina sobre o comportamento depressivo de animais adultos, os quais foram privados dos cuidados maternos nos primeiros dias após o nascimento. A exemplo de outros estudos, o estresse da privação materna aumentou o tempo de imobilidade no teste de natação forçada, indicando um comportamento em animais, semelhante à depressão e confirmando que as experiências traumáticas na infância podem culminar com a depressão na idade adulta (Réus et al., 2013; Réus et al., 2015b). O tratamento crônico com quetiapina reduziu significativamente o comportamento depressivo. O efeito antidepressivo da quetiapina também foi demonstrado em outro estudo, no qual animais adultos foram submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado (Wang et al., 2013). Esses autores observaram uma ação antidepressiva de quetiapina em animais resistentes ao tratamento com fluoxetina. No presente estudo, a quetiapina induziu um efeito antidepressivo significativo nos animais submetidos ao estresse no início da vida, uma condição que tem sido destacada como um pivô da



falta de resposta aos tratamentos antidepressivos em pacientes com TDM (Nanni et al, 2012; Williams et al., 2016) e em animais que apresentam comportamentos semelhantes à depressão (Zhang et al., 2015). Estes últimos autores observaram que animais, nos quais a privação materna aumentou o efeito do estresse crônico em adultos, exibiram comportamento tipo depressivo e o excitalopram, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS), foi menos efetivo em reverter o comportamento tipo depressivo.

Este e outros estudos (El Dine, 2015) revelaram que a quetiapina administrada cronicamente e como monoterapia exerceu significativo efeito tipo antidepressivo. Em pacientes TDM, alguns autores também mostraram que a quetiapina administrada cronicamente e como monoterapia, exerceu significativo efeito antidepressivo (Maneeton et al., 2012; Bortnick et al., 2011), como também reduziu a ansiedade em pacientes TDM com ansiedade comorbida (Galynker et al., 2005). Portanto, a quetiapina, além de exercer uma função antidepressiva como terapia adjuntiva, quando administrada com outras drogas antidepressivas, também exerce efeito antidepressivo quando administrada como monoterapia.

No teste do campo aberto, o tratamento crônico com quetiapina promoveu uma redução significativa nos cruzamentos e levantamentos, quando comparado com animais privados e tratados com salina, um resultado que sugere uma função sedativa da quetiapina administrada uma hora antes do teste. De fato, a quetiapina tem efeito sedativo rápido após a sua administração em humanos com TDM (Todder et al., 2006), sendo uma das suas limitações como terapia farmacológica na depressão (Cha e McIntyre, 2012). Contudo, os resultados desta etapa devem ser interpretados com alguns cuidados, tendo em vista que na avaliação anterior no teste do campo aberto, somente a dose de 80 mg/kg reduziu a atividade locomotora. Alguns estudos observaram que ratos privados maternalmente (PM) nos 9<sup>o</sup> e 10<sup>o</sup> dias após o nascimento, apresentaram aumento da atividade locomotora na adolescência (Marco et al., 2007) e na vida adulta (Rentesi et al., 2013). No presente estudo, animais PM e tratados com salina apresentaram um pequeno aumento da atividade locomotora, quando comparados a animais não privados. Embora o aumento da atividade locomotora não tenha sido significativo, a janela de resposta entre animais privados e a pequena redução promovida pela quetiapina culminou em um efeito significativo entre animais privados, tratados com salina e animais tratados com quetiapina. Não obstante a

um possível efeito da quetiapina em restaurar uma hiper locomoção nos animais PM, a quetiapina promove melhora nos padrões e arquitetura do sono, mesmo antes do efeito antidepressivo. Além disso, foi sugerido que o efeito benéfico sobre os padrões do sono pode agir de forma sinérgica a outros mecanismos eliciados pela quetiapina para a resposta terapêutica antidepressiva, quando adicionada aos antidepressivos clássicos ou como monoterapia (Todder et al., 2006). Outra característica importante é que os efeitos sedativos da quetiapina são rápidos, mas não são extrapolados para o dia, quando a administração ocorre a noite (Todder et al., 2006). É também importante considerar que os animais tratados com quetiapina mostraram uma redução significativa no tempo de imobilidade no teste de natação forçada, indicando que o efeito da quetiapina não prejudicou o efeito antidepressivo nos animais submetidos ao estresse de privação materna. Neste estudo, a quetiapina foi administrada cronicamente e como monoterapia, exercendo um significativo efeito antidepressivo e corroborando estudos com pacientes com TDM em comorbidade com transtornos de ansiedade, nos quais a quetiapina administrada cronicamente como monoterapia exerceu significativa melhora do humor e redução da ansiedade (Galyner et al., 2005).

É difícil identificar os mecanismos de ação subjacentes ao efeito terapêutico antidepressivo, considerando que a quetiapina atua através de uma ampla variedade de mecanismos neurobiológicos (Saller e Salama, 1993). Entretanto, é importante notar que o fármaco aumenta a liberação de dopamina em regiões cerebrais envolvidas com transtornos de humor, tais como o córtex pré-frontal (Prieto et al, 2010) e núcleo accumbens (Rogóz, 2013). Este efeito da quetiapina é sugerido como sendo importante na melhora dos sintomas afetivos e cognitivos subjacentes ao TDM (Prieto et al., 2010). Além da dopamina, a quetiapina também parece ter um benefício terapêutico ao aumentar os níveis extracelulares de noradrenalina, através do bloqueio de receptores 5-HT<sub>2C</sub> (Blier et al., 2011), os quais exercem influência inibitória tônica sobre vias dopaminérgicas e noradrenérgica no córtex pré-frontal (Millan et al., 2003). Blier et al. (2011) também postulou que pacientes TDM não responsivos a IRSRs, podem estar com a atividade noradrenérgica reduzida, tendo em vista que os IRSRs reduzem as taxas de disparos de neurônios noradrenérgicos no loco cerúleo, através da ativação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> sobre neurônios inibitórios gabaérgicos, os quais modulam os neurônios noradrenérgicos. Com relação à

atividade noradrenérgica é importante destacar que a quetiapina apresenta potente ação bloqueadora sobre transportadores de noradrenalina nos terminais sinápticos e também é um potente antagonista de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos (Richelson and Souder, 2000; Baune et al., 2008; Chernoloz et al., 2012) cujos mecanismos aumentam a disponibilidade de noradrenalina nas fendas sinápticas. Além da atividade noradrenérgica, é importante considerar que o aumento da atividade dopaminérgica parece ser um mecanismo relacionado com efeito terapêutico em indivíduos com DRT, como sugerido por Hsiao et al. (2013).

O estresse no início da vida, além de ser um grande vilão no desencadeamento de transtornos de humor, é um fenômeno fortemente envolvido na severidade da depressão e na pobre resposta, tanto para tratamentos farmacológicos, quanto para psicoterapias. Essas características parecem envolver ampla variedade de alterações fisiológicas, bem como mudanças estruturais e funcionais do SNC. Embora uma rede de fenômenos biológicos esteja envolvida, os fatores desencadeantes ainda não foram elucidados. Entretanto, os estudos sobre fenômenos epigenéticos vêm mostrando que a programação epigenética sofre mudanças a partir de traumas na infância e parece estar subjacente a muitas alterações estruturais e funcionais envolvidas na depressão, entre outros transtornos psiquiátricos (Ignácio et al., 2014; Nemeroff, 2016). Portanto, além da resposta comportamental, outra proposta importante nesta etapa do estudo foi verificar a ocorrência de alteração em parâmetros epigenéticos e o efeito da quetiapina sobre esses parâmetros em animais submetidos ao estresse de privação materna. Os animais adultos que foram privados maternalmente apresentaram um aumento da atividade enzimática da HDAC e DNAMT no hipocampo e no núcleo accumbens, corroborando outros resultados na literatura científica (Weaver et al., 2004; Réus et al., 2013). O aumento da atividade dessas enzimas está associado com menor transcrição de genes (Jones e Takai, 2001; Kouzarides, 2007). É importante destacar que uma função aumentada de HDACs foi relacionada com comportamento depressivo em modelos animais e reduzida resposta terapêutica a antidepressivos (Tsankova et al., 2006; Dyrvig et al., 2012). Também é importante observar que o tratamento crônico com antidepressivos promoveu alterações no sentido de reverter as mudanças epigenéticas relacionadas com depressão (Réus et al., 2013; Suri et al., 2013) e mitigar os prejuízos na neurogênese hipocampal, possivelmente

subjacentes às mudanças epigenéticas decorrentes do estresse no início da vida (Suri et al., 2013).

O tratamento crônico com quetiapina não reverteu significativamente a atividade da HDAC nas regiões cerebrais avaliadas neste estudo, embora tenha havido uma pequena redução da atividade enzimática no hipocampo e núcleo accumbens. No entanto, acerca da atividade de DNAMT, a quetiapina reduziu significativamente o aumento na atividade da enzima no hipocampo e promoveu uma redução não significativa da atividade enzimática no núcleo accumbens. Alguns estudos têm mostrado que a quetiapina, bem como outros derivados de dibenzepina, como a clozapina e olanzapina, também apresentam efeitos em mecanismos epigenéticos, reduzindo a metilação de genes no SNC, ao contrário do haloperidol, derivado de butirofenona, e da risperidona, derivado piperidil-benzisoxazol (Guidotti et al., 2011; Guidotti e Grayson, 2014). Outro importante estudo, utilizando cultura de células de neuroblastoma humano, mostrou que a quetiapina promoveu hipometilação em uma grande variedade de genes, sendo que uma grande parte dos genes hipometilados pertence a regiões promotoras localizadas junto as denominadas ilhas CpG (Sugawara et al., 2015). Outra constatação importante destes últimos estudos foi uma redução da metilação do DNA no sítio CpG específico da região promotora do gene do transportador de serotonina, 5-HTT, uma vez que polimorfismos genéticos dessa região estão associados com redução da atividade transcricional e uma maior interação entre gene x estresse no início da vida, resultando em depressão ao longo da vida (Ignácio et al., 2014). Sobre o polimorfismo do transportador de serotonina é relevante destacar o fato de que o genótipo associado com reduzida atividade transcricional, também está associado com pobre resposta de pacientes ao tratamento com antidepressivos clássicos (Serretti et al., 2007). Outra evidência importante é que a variante polimórfica do gene 5-HTT, a qual exibiu maior nível de metilação e menor atividade transcricional, também foi associada com menor volume hipocampal em pacientes TDM (Eker et al., 2011).

Também é importante observar que a quetiapina reverteu a redução da neurogênese hipocampal em animais submetidos a estresse crônico (Luo et al., 2005; Xu et al., 2006). Adicionalmente, a neurogênese, paralela ao efeito tipo antidepressivo promovidos pela quetiapina, foram demonstrados em ratos submetidos a estresse crônico e não responsivos aos efeitos da fluoxetina, um ISRS (Wang et al.,

2013). O estresse de privação materna atenuou a diferenciação de células precursoras de neurônios hipocâmpais adultos e aumentou a expressão de DNAMT. Outra interessante descoberta desses autores foi que inibidores da DNAMT revertiriam a redução da diferenciação de células precursoras de neurônios hipocâmpais adultos (Boku et al., 2015). Portanto, o efeito da quetiapina sobre a neurogênese hipocâmpal pode estar, pelo menos parcialmente, relacionado com sua habilidade em reduzir a atividade de enzimas DNAMT.

A atividade da DNAMT aumentou no córtex pré-frontal de animais submetidos à privação materna e tratados com quetiapina. Este resultado parece paradoxal quando comparado com os resultados de outros estudos. No entanto, é importante observar que os estudos, os quais observaram redução na metilação de DNA no córtex pré-frontal, foram direcionados a regiões promotoras específicas de genes associados com outras patologias, cujos processos de metilação e de desmetilação parecem exigir intermediação de outros marcadores moleculares (Guidotti e Grayson, 2014). Como discutido pelos autores, a metilação de regiões promotoras em neurônios é um processo dinâmico, o qual envolve muitos fatores, entre os quais podem estar as regiões cerebrais envolvidas, a psicopatologia e as funções relevantes para a respectiva doença ou transtorno psiquiátrico. Além da carência de estudos acerca do efeito da quetiapina sobre parâmetros epigenéticos, na literatura científica também não existem dados envolvendo o perfil da quetiapina e outros antipsicóticos atípicos sobre mecanismos de metilação de DNA no córtex pré-frontal. Um estudo mostrou que os antipsicóticos atípicos clozapina e a risperidona induziram aumento na metilação de alguns genes, enquanto reduziram a metilação de outros genes no córtex pré-frontal, possivelmente como um efeito positivo sobre comportamentos relacionados a esquizofrenia e outros transtornos psiquiátricos (Santoro et al., 2014). Portanto, mais estudos são necessários, no sentido revelar a possível função protetora ou prejudicial da quetiapina sobre parâmetros epigenéticos no córtex pré-frontal, como também outras características biológicas que envolvem a função da quetiapina, assim como outros antipsicóticos atípicos no tratamento do TDM.

## 6. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÃO

Os resultados observados neste estudo acerca do efeito da quetiapina em alguns mecanismos fisiológicos, bem como nos parâmetros comportamentais avaliados no teste de natação forçada, adicionam sugestões de que a quetiapina desempenha um papel relevante como terapia na depressão recorrente e em indivíduos resistentes a outros tratamentos. Alguns autores observaram que o estresse de privação materna, além de aumentar a imobilidade no teste de natação forçada, induziu redução da atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial (Valvassori et al., 2015). Prejuízos na função mitocondrial estão relacionados a aumento no estresse oxidativo. Por sua vez, um aumento do estresse oxidativo e nitrosativo está relacionado com disfunção mitocondrial, gerando um ciclo vicioso que culmina em neurodegeneração (Federico et al., 2012). O estresse oxidativo e a neurodegeneração são fenômenos subjacentes à depressão severa ou resistente a tratamentos (Mokoena et al., 2015), assim como o estresse no início da vida (Nanni et al., 2012). No presente estudo, o estresse de privação materna aumentou a imobilidade no teste de natação forçada, como também a atividade da enzima HDAC no hipocampo e núcleo accumbens, assim como da DNAMT hipocampal. A quetiapina reverteu os efeitos da privação materna, tanto no teste comportamental, quanto na metilação de DNA hipocampal, sugerindo que, pelo menos, um dos mecanismos subjacentes a ação da quetiapina foi sua interferência nos mecanismos epigenéticos sobre a atividade transcricional. A redução transcricional de genes relacionados a mecanismos de plasticidade neuronal, como por exemplo, o BDNF e também de proteínas envolvidas na disponibilidade sináptica de neurotransmissores, como o transportador de serotonina, é um dos fenômenos subjacentes ao prejuízo no processo de resiliência que ocorre em indivíduos submetidos a traumas na infância. No presente estudo a quetiapina, de uma forma geral, aumentou a atividade de complexos da cadeia mitocondrial e mostrou um efeito benéfico sobre o balanço oxidativo. Alguns autores mostraram que a quetiapina protegeu a mitocôndria contra os efeitos de substâncias tóxicas sobre a síntese de ATP na cadeia respiratória mitocondrial, possivelmente por sua ação antioxidante no processo de peroxidação lipídica (Xuan et al., 2015). Portanto, além de interferir positivamente em mecanismos epigenéticos e, possivelmente aumentar a atividade transcricional no hipocampo e núcleo accumbens, a função terapêutica antidepressiva da quetiapina

parece envolver um efeito positivo no balanço oxidativo e na função da cadeia respiratória mitocondrial em regiões cerebrais envolvidas com transtornos de humor.

**REFERÊNCIAS**

- Abdallah CG, Adams TG, Kelmendi B, Esterlis I, Sanacora G, Krystal JH. Ketamine's mechanism of action: a path to rapid-acting antidepressants. *Depress Anxiety*. 2016; doi: 10.1002/da.22501.
- Abelaira HM, Réus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013; 35(Suppl 2): S112-20.
- Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(9-10): 1140-1149.
- Agostinho FR, Scaini G, Ferreira GK, Jeremias IC, Réus GZ, Rezin GT, Castro AA, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Effects of olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine on creatine kinase activity in rat brain. *Brain Res Bull*. 2009; 80(6): 337-340.
- Altar CA. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci*. 1999; 20:59-61.
- aan het Rot M, Mathew SJ, Charney DS. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ*. 2009; 180(3): 305-313.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-126.
- Alleva E, Santucci D. Psychosocial vs. "physical" stress situations in rodents and humans: role of neurotrophins. *Physiol Behav*. 2001; 73(3): 313-320.
- Aloe L, Alleva E, Fiore M. Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 73(1): 159-66.
- Angelucci F, Aloe L, Vasquez PJ, Mathé AA. Mapping the differences in the brain concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in an animal model of depression. *Neuroreport*. 2000; 11(6): 1369-1373.
- Anglin RES, Tarnopolsky MA, Mazurek MF, Rosebush PI. Mitochondrial Involvement in Psychiatric Illness in Adults. *Curr Psychiatry Rev*. 2014; 10; 192-199.
- Assis LC, Scaini G, Di-Pietro PB, Castro AA, Comim CM, Streck EL, Quevedo J. Effect of antipsychotics on creatine kinase activity in rat brain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007; 101(5): 315-319.



- Assis LC, Rezin GT, Comim CM, Valvassori SS, Jeremias IC, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Effect of acute administration of ketamine and imipramine on Creatine kinase activity in the brain of rats. *Rev Bras Psiquiatr.* 2009; 31(3): 247-252.
- Balijepalli S, Kenchappa RS, Boyd MR, Ravindranath V. Protein thiol oxidation by haloperidol results in inhibition of mitochondrial complex I in brain regions: comparison with atypical antipsychotics. *Neurochem Int.* 2001; 38(5): 425-435.
- Banerjee R, Ghosh AK, Ghosh B, Bhattacharyya S, Mondal AC. Decreased mRNA and protein expression of BDNF, NGF, and their receptors in the hippocampus from suicide: an analysis in human postmortem brain. *Clin Med Insights Pathol.* 2013; 6:1-11.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32:279-312.
- Barnes DE, Alexopoulos GS, Lopez OL, Williamson JD, Yaffe K. Depressive symptoms, vascular disease, and mild cognitive impairment: findings from the Cardiovascular Health Study. *Arch Gen Psychiatry.* 2006; 63: 273-9.
- Baune BT. New developments in the management of major depressive disorder and generalized anxiety disorder: role of quetiapine. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008; 4(6): 1181-1191.
- 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.
- Belmaker RH, Agam G. Major Depressive Disorder. *N Engl J Med.* 2008; 358: 55-68.
- Ben-Shachar D. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine. *J Neurochem.* 2002; 83(6): 1241-1251.
- Ben-Shachar D, Karry R. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PLoS One.* 2008; 3(11): e3676.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* 5th edition. New York: W H Freeman; 2002.
- Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 137-151.
- Berk M, Dodd S. Efficacy of atypical antipsychotics in bipolar disorder. *Drugs.* 2005; 65(2): 257-69.

- Bessman SP, Carpenter CL. The creatine–creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem.* 1985; 54: 831-62.
- Bian Q, Kato T, Monji A, Hashioka S, Mizoguchi Y, Horikawa H, Kanba S. The effect of atypical antipsychotics, perospirone, ziprasidone and quetiapine on microglial activation induced by interferon-gamma. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; 32(1): 42-48.
- Bilici M, Efe H, Koroğlu 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.
- Bird A. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1986; 321: 209–213.
- Black CN, Bot M, Scheffer PG, Cuijpers P, Penninx BW. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 51: 164-175.
- Blass JP. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res.* 2001; 66: 851-856. 2001.
- Blier P, Blondeau C. Neurobiological bases and clinical aspects of the use of aripiprazole in treatment-resistant major depressive disorder. *J Affect Disord.* 2011; 128 Suppl 1: S3-10.
- Boekema EJ, Braun HP. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem.* 2007; 282(1): 1-4.
- Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav.* 2013; 118: 227-39.
- Boku S, Toda H, Nakagawa S, Kato A, Inoue T, Koyama T, Hiroi N, Kusumi I. Neonatal maternal separation alters the capacity of adult neural precursor cells to differentiate into neurons via methylation of retinoic acid receptor gene promoter. *Biol Psychiatry.* 2015; 77(4): 335-44.
- Boot E, de Haan L. Massive increase in serum creatine kinase during olanzapine and quetiapine treatment, not during treatment with clozapine. *Psychopharmacology.* 2000;150:347-348.

- Bortnick B, El-Khalili N, Banov M, Adson D, Datto C, Raines S, Earley W, Eriksson H. Efficacy and tolerability of extended release quetiapine fumarate (quetiapine XR) monotherapy in major depressive disorder: a placebo-controlled, randomized study. *J Affect Disord*. 2011; 128(1-2): 83-94.
- Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, Delaney RC, McCarthy G, Charney DS, Innis RB. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*. 1995; 152: 973-981.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reductions in major depression. *Am J Psychiatry*. 2000; 157: 115-117.
- Burkhardt C, Kelly JP, Lim YH, Filley CM, Parker WD Jr. Neuroleptic medications inhibit complex I of the electron transport chain. *Ann Neurol*. 1993; 33(5): 512-517.
- Burmeister M. Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Biol Psychiatry*. 1999; 45: 522-532.
- Byun J, Henderson JP, Mueller DM, Heinecke JW. 8-Nitro-2'-deoxyguanosine, a specific marker of oxidation by reactive nitrogen species, is generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system of activated human phagocytes. *Biochemistry*. 1999; 38(8): 2590-600.
- Calabrese JR, Keck PE Jr, Macfadden W, Minkwitz M, Ketter TA, Weisler RH, Cutler AJ, McCoy R, Wilson E, Mullen J. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of quetiapine in the treatment of bipolar I or II depression. *Am J Psychiatry*. 2005; 162(7): 1351-1360.
- Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8: 766-775.
- Calabrese F, Molteni R, Racagni G, Riva MA. Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34S: S208-S216.
- Casademont J, Garrabou G, Miró O, López S, Pons A, Bernardo M, Cardellach F. Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2007; 27(3): 284-288.

- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington HL, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003; (301):386–389.
- Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 328(2): 309-316.
- Castrén E, Vöikar V, Rantamäki T. Role of neurotrophic factors in depression. *Curr Opin Pharmacol*. 2007; 7:18-21.
- Cha DS, McIntyre RS. Treatment-emergent adverse events associated with atypical antipsychotics. *Expert Opin. Pharmacother*. 2012; 13 (11): 1587-1598.
- Che Y, Zhou Z, Shu Y, Zhai C, Zhu Y, Gong S, Cui Y, Wang JF. Chronic unpredictable stress impairs endogenous antioxidant defense in rat brain. *Neurosci Lett*. 2015; 584: 208-13.
- Cheer SM, Wagstaff AJ. Quetiapine – A review of its use in the management of schizophrenia. *CNS Drugs*. 2004; 18(3): 173-99.
- Chernoloz O, El Mansari M, Blier P. Effects of sustained administration of quetiapine alone and in combination with a serotonin reuptake inhibitor on norepinephrine and serotonin transmission. *Neuropsychopharmacology*. 2012; 37(7): 1717-28.
- Cohrs S, Rodenbeck A, Guan Z, Pohlmann K, Jordan W, Meier A, Rütther E. Sleep-promoting properties of quetiapine in healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004; 174(3): 421-429.
- Cohrs S, Röher C, Jordan W, Meier A, Huether G, Wuttke W, Rütther E, Rodenbeck A. The atypical antipsychotics olanzapine and quetiapine, but not haloperidol, reduce ACTH and cortisol secretion in healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006; 185(1): 11-18.
- Croissant B, Klein O, Gehrlein L, Kniest A, Hermann D, Diehl A, Mann K. Quetiapine in relapse prevention in alcoholics suffering from craving and affective symptoms: a case series. *Eur Psychiatry*. 2006; 21(8): 570-3.
- Cross AJ, Widzowski D, Maciag C, Zacco A, Hudzik T, Liu J, Nyberg S, Wood MW. Quetiapine and its metabolite norquetiapine: translation from in vitro pharmacology to in vivo efficacy in rodent models. *Br J Pharmacol*. 2016; 173(1): 155-66.

- Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23(5): 238-245.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(9): 775-790.
- Cryan JF, Slattery DA. Animal models of mood disorders: recent developments. *Curr Opin Psychiatry.* 2007; 20(1): 1-7.
- Cuijpers P, Smit F. Excess mortality in depression: a meta-analysis of community studies. *J Affect Disord.* 2002; 72 (3): 227-236.
- Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr.* 2015; 66(3): 393-405.
- Dalton VS, Kolshus E, Mcloughlin DM. Epigenetics and depression: return of the repressed. *J Affect Disord.* 2014; 155: 1-12.
- Daly EJ, Trivedi MH. A review of quetiapine in combination with antidepressant therapy in patients with depression. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2007; 3(6): 855-867.
- De Carlo V, Calati R, Serretti A. Socio-demographic and clinical predictors of non-response/non-remission in treatment resistant depressed patients: A systematic review. *Psychiatry Res.* 2016; 240: 421-30.
- 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.
- Della FP, Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Antunes AR, Scaini G, Jeremias IC, dos Santos LM, Jeremias GC, Streck EL, Quevedo J. Tianeptine treatment induces antidepressant-like effects and alters BDNF and energy metabolism in the brain of rats. *Behav Brain Res.* 2012; 233(2): 526-535.
- Demyttenaere K, Bonnewyn A, Bruffaerts R, Brugha T, De Graaf R, Alonso J. Comorbid painful physical symptoms and depression: prevalence, work loss, and help seeking. *J Affect Disord.* 2006; 92:185-93.
- Detke MJ, Johnson J, Lucki I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Exp Clin Psychopharmacol.* 1997; 5(2):107-12.

- Dhir A, Kulkarni SK. Involvement of L-arginine-nitric oxidecyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressantlike effect of venlafaxine in mice. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*. 2007; 31: 921-925.
- Dietrich-Muszalska A, Kontek B, Rabe-Jabłońska J. Quetiapine, olanzapine and haloperidol affect human plasma lipid peroxidation in vitro. *Neuropsychobiology*. 2011; 63(4): 197-201
- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lancôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010; 67(5): 446-457.
- Drevets WC, Price JL, Simpson JR, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature*. 1997; 386: 824-827.
- Drevets WC. Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 985: 420-444.
- Duman RS; Malberg J; Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*. 1999; 46:1181-1191.
- Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2006; 59:1116-1127.
- Dunn RT, Kimbrell TA, Ketter TA, Frye MA, Willis MW, Luckenbaugh DA, Post RM. Principal components of the Beck Depression Inventory and regional cerebral metabolism in unipolar and bipolar depression. *Biol Psychiatry*. 2002; 51: 387-399.
- Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 2003; 60:804-815.
- Dyrvig M, Hansen HH, Christiansen SH, Woldbye DP, Mikkelsen JD, Lichota J. Epigenetic regulation of Arc and c-Fos in the hippocampus after acute electroconvulsive stimulation in the rat. *Brain. Res. Bull*. 2012; 88(5): 507-13.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(23): 13632-7.
- Eker MC, Kitis O, Okur H, Eker OD, Ozan E, Isikli S, Akarsu N, Gonul AS. Smaller hippocampus volume is associated with short variant of 5-HTTLPR polymorphism in medication-free major depressive disorder patients. *Neuropsychobiology*. 2011; 63(1): 22-8.

- El Dine SMKS. 2015. An increase in GABA content in Hippocampus of Albino rats exposed to chronic restraint model and treated by Quetiapine for 3 weeks. *J Pharm Innov.* 2015; 3(12): 89-93.
- Elmelegy AAM, Kamal SM. Modulation of Glutamate and GABA Contents by Quetiapine in Nucleus Accumbens of Chronic Mild Stressed Albino Rats. *J Pharmacol Res.* 2013; 3(1): 59-63.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186:407-421.
- Falkai P, Wobrock T, Lieberman J, Glenthøj B, Gattaz WF, Möller HJ, WFSBP Task Force on Treatment Guidelines for Schizophrenia. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of schizophrenia, Part 1: acute treatment of schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 2005; 6:132-191.
- Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 2012; 322(1-2): 254-62.
- Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev.* 2014; 33(2):79-97
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1997; 47: 61-68.
- Ferreira GK, Cardoso MR, Jeremias IC, Gonçalves CL, Freitas KV, Antonini R, Scaini G, Rezin GT, Quevedo J, Streck EL. Fluvoxamine alters the activity of energy metabolism enzymes in the brain. *Rev Bras Psiquiatr.* 2014; 36(3): 220-226.
- Ferret PJ, Soum E, Negre O, Wollman EE, Fradelizi D. Protective effect of thioredoxin upon NO-mediated cell injury in THP1 monocytic human cells. *Biochem J.* 2000; 346(Pt 3): 759-65.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; 153(1): 23-36.
- Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222(3): 236-245.

- Gałecki P, Florkowski A, Bobińska K, Śmigielski J, Bieńkiewicz M, Szemraj J. Functional polymorphism of the myeloperoxidase gene (G-463A) in depressive patients. *Acta Neuropsychiatr.* 2010; 22(5): 218-22.
- Gałecki P, Maes M, Florkowski A, Lewiński A, Gałecka E, Bieńkiewicz M, Szemraj J. Association between inducible and neuronal nitric oxide synthase polymorphisms and recurrent depressive disorder. *J Affect Disord.* 2011; 129(1-3): 175-82.
- Galynker I, Khan A, Grebchenko Y, Ten A, Malaya L, Yanowitch P, Cohen LJ. Low-dose risperidone and quetiapine as monotherapy for comorbid anxiety and depression. *J. Clin. Psychiatry.* 2005; 66(4): 544.
- Gamaro GD, Streck EL, Matté C, Prediger ME, Wyse AT, Dalmaz C. Reduction of hippocampal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Res.* 2003; 28(9): 1339-1344.
- Garabadu D, Ahmad A, Krishnamurthy S. Risperidone Attenuates Modified Stress-Re-stress Paradigm-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in Rats Exhibiting Post-traumatic Stress Disorder-Like Symptoms. *J Mol Neurosci.* 2015; 56(2): 299-312.
- 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(1): 140-144.
- Gardner A, Johansson A, Wibom R, Nennesmo I, von Döbeln U, Hagenfeldt L, Hällström T. Alterations of mitochondrial function and correlations with personality traits in selected major depressive disorder patients. *J Affect Disord.* 2003; 76(1-3): 55-68.
- Gerritsen L, Comijs HC, van der Graaf Y, Knoops AJG, Penninx BWJH, Geerlings MI. Depression, hypothalamic pituitary adrenal axis, and hippocampal and entorhinal cortex volumes - The SMART Medea Study. *Biol Psychiatry.* 2011; 70: 373-380.
- Gonçalves AF, Coelho R. Depressão e tratamento: Apoptose, Neuroplasticidade e Antidepressivos. *Acta Med Port.* 2006; 19: 9-20.



- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1997; 17: 2492-2498.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126:131-138.
- Guidotti A, Auta J, Chen Y, Davis JM, Dong E, Gavin DP, Grayson DR, Matriciano F, Pinna G, Satta R, Sharma RP, Tremolizzo L, Tueting P. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology.* 2011; 60(7-8): 1007-1016.
- Guidotti A, Grayson DR. DNA methylation and demethylation as targets for antipsychotic therapy. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2014; 16(3), 419-429.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-255.
- Han JH, Tian HZ, Lian YY, Yu Y, Lu CB, Li XM, Zhang RL, Xu H. Quetiapine mitigates the ethanol-induced oxidative stress in brain tissue, but not in the liver, of the rat. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015; 11: 1473-82.
- Harman D. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging* 1993; 3:60-80.
- Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 2013; 1: 483-91.
- Hodes E, Hill-Smith TE, Lucki I. Fluoxetine treatment induces dose dependent alterations in depression associated behavior and neural plasticity in female mice. *Neurosci Lett.* 2010; 484(1):12-16.
- Hodes GE, Pfau ML, Leboeuf M, Golden SA, Christoffel DJ, Bregman D, Rebusi N, Heshmati M, Aleyasin H, Warren BL, Lebonoté B, Horn S, Lapidus KA, Stelzhammer V, Wong EH, Bahn S, Krishnan V, Bolaños-Guzman CA, Murrrough JW, Merad M, Russo SJ. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(45): 16136-41.

- Holmans P, Weissman MM, Zubenko GS, Scheftner WA, Crowe RR, Depaulo JR. et al. Genetics of recurrent early-onset major depression (GenRED): final genome scan report. *Am J Psychiatry*. 2007; 164: 248-258.
- Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I. Central administration of IGF1 and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res*. 2005; 1037: 204-208.
- Hroudova J, Fisar Z. Activities of respiratory chain complexes and citrate synthase influenced by pharmacologically different antidepressants and mood stabilizers. *Neuro Endocrinol Lett*. 2010; 31(3): 336-42.
- Hroudova J, Fisar Z. In vitro inhibition of mitochondrial respiratory rate by antidepressants. *Toxicol Lett*. 2012; 213(3): 345-352.
- Hsiao MC, Lin KJ, Liu CY, Schatz DB. The interaction between dopamine transporter function, gender differences, and possible laterality in depression. *Psychiatry Res*. 2013; 211(1): 72-7.
- Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clinic Chimica Acta*. 1962; 7: 597-604.
- Hughes MN. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1411: 263-72.
- Ignácio ZM, Réus GZ, Abelaira HM, Quevedo J. Epigenetic and epistatic interactions between serotonin transporter and brain-derived neurotrophic factor genetic polymorphism: insights in depression. *Neuroscience*. 2014; 275: 455-468.
- Jensen NH, Rodriguiz RM, Caron MG, Wetsel WC, Rothman RB, Roth BL. N-desalkylquetiapine, a potent norepinephrine reuptake inhibitor and partial 5-HT<sub>1A</sub> agonist, as a putative mediator of quetiapine's antidepressant activity. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(10): 2303-2312.
- Ji B, La Y, Gao L, Zhu H, Tian N, Zhang M, Yang Y, Zhao X, Tang R, Ma G, Zhou J, Meng J, Ma J, Zhang Z, Li H, Feng G, Wang Y, He L, Wan C. A comparative proteomics analysis of rat mitochondria from the cerebral cortex and hippocampus in response to antipsychotic medications. *J Proteome Res*. 2009; 8(7): 3633-3641.
- Jones P, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 2001; 293: 1068-1070.

- Jou SH, Chiu NY, Liu CS. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Chang Gung Med J*. 2009; 32(4):370-379.
- Kavalidou K, De Leo D. Are low brain derived neurotrophic factor levels in the blood a biological marker of suicide risk in psychiatric patients? A systematic review. *J Neurol Res*. 2013; 3(1):12-19.
- Keller MB, Lavori PW, Mueller TI, Endicott J, Coryell W, Hirschfeld RMA, Shea T. Time to recovery, chronicity and levels of psychopathology in major depression. A 5-year prospective follow up of 431 subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 1992; 49:809-81.
- Kim YK, Lee HP, Won SD, Park E-Y, Lee H-Y, Lee B-H, Lee S-W, Yoon D, Han C, Kim D-J, Choi S-H. Low plasma BDNF is associated with suicidal behavior in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31: 78-85.
- Kimpton J. The brain derived neurotrophic factor and influences of stress in depression. *Psychiatr Danub*. 2012; 24(1):169-171.
- Kinnally EL, Capitanio JP, Leibel R, Deng L, LeDuc C, Haghghi F, Mann JJ. Epigenetic regulation of serotonin transporter expression and behavior in infant rhesus macaques. *Genes Brain Behav*. 2010; 9: 575-582.
- Klein JP, Fiedler U, Appel H, Quante A, Jockers-Scherübl MC. Massive creatine kinase elevations with quetiapine: report of two cases. *Pharmacopsychiatry*. 2006; 39: 39-40.
- Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R, Liu XS, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski JP, Rao A. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010; 468(7325): 839-43.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128: 693-705.
- Kropp S, Kern V, Lange K, Degner D, Hajak G, Kornhuber J, Rütger E, Emrich HM, Schneider U, Bleich S. Oxidative stress during treatment with first- and second-generation antipsychotics. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005; 17(2): 227-231.
- Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays*. 1998; 20(8): 615-626.
- Lang UE, Hellweg R, Gallinat J. BDNF serum concentrations in healthy volunteers are associated with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29: 795-798.

- Lange C, Irle E. Enlarged amygdala volume and reduced hippocampal volume in young women with major depression. *Psychol Med.* 2004; 34: 1059-1064.
- 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.
- 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.
- Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(5):726-31.
- Leuchter AF, Cook IA, Hamilton SP, Narr KL, Toga A, Hunter AM, Faull K, Whitelegge J, Andrews AM, Loo J, Way B, Nelson SF, Horvath S, Lebowitz BD. Biomarkers to predict antidepressant response. *Curr Psychiatry Rep.* 2010; 12(6): 553-562.
- Levine S, Chevalier JA, Korchin SJ. The Effects of Early Shock and Handling on Later Avoidance Learning. *J Personality.* 1956; 24: 475-493.
- 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.
- Levine S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol Behav.* 2001; 73(3): 255-260.
- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009; 462(7271): 315-322.
- Liu Y, Lan N, Ren J, Wu Y, Wang ST, Huang XF, Yu Y. Orientin improves depression-like behavior and BDNF in chronic stressed mice. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59(6): 1130-42.
- 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.
- Luo C, Xu H, Li XM. Quetiapine reverses the suppression of hippocampal neurogenesis caused by repeated restraint stress. *Brain Res.* 2005; 1063(1): 32-39.
- Lutz PE, Turecki G. DNA methylation and childhood maltreatment: from animal models to human studies. *Neuroscience.* 2014; 264: 142-156.
- Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 2001; 24(4): 420-429.
- Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, Perini G, Kubera M, Bob P, Lerer, B, Maj M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab. Brain Dis.* 2009; 24(1): 27-53.
- 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: 676-692.
- Mancuso M, Orsucci D, Ienco EC, Pini E, Choub A, Siciliano G. Psychiatric involvement in adult patients with mitochondrial disease. *Neurol Sci.* 2013; 34(1): 71-74.
- Maneeton N, Maneeton B, Srisurapanont M, Martin SD. Quetiapine monotherapy in acute phase for major depressive disorder: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *BMC Psychiatry.* 2012; 12: 160.
- Manji H, Kato T, Di Prospero NA, Ness S, Beal MF, Krams M, Chen G. Impaired mitochondrial function in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13(5): 293-307.

- Marazita ML, Neiswanger K, Cooper M, Zubenko GS, Giles DE, Frank, E, Kupfer DJ, Kaplan BB. Genetic segregation analysis of early-onset recurrent unipolar depression. *Am J Hum Genet.* 1997; 61: 1370-1378.
- Marco EM, Adriani W, Canese R, Podo F, Viveros MP, Laviola G. Enhancement of endocannabinoid signalling during adolescence: modulation of impulsivity and long-term consequences on metabolic brain parameters in early maternally deprived rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007; 86: 334-345.
- Marmorstein R, Triebel RC. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1789(1): 58-68.
- Martins MR, Petronilho FC, Gomes KM, Dal-Pizzol F, Streck EL, Quevedo J. Antipsychotic-induced oxidative stress in rat brain. *Neurotox Res.* 2008; 13(1):63-9.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron.* 2008; 60(5): 748-766.
- Maurer I, Möller HJ. Inhibition of complex I by neuroleptics in normal human brain cortex parallels the extrapyramidal toxicity of neuroleptics. *Mol Cell Biochem.* 1997; 174(1-2): 255-259.
- McArthur R, Borsini F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006; 84(3): 436-452.
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci.* 2009; 12(3): 342-348.
- McIntyre RS, Soczynska JK, Woldeyohannes HO, Alsuwaidan M, Konarski JZ. A preclinical and clinical rationale for quetiapine in mood syndromes. *Expert Opin Pharmacother.* 2007; 8(9): 1211-1219.
- Meltzer HY, Cola PA, Parsa M. Marked elevations of serum creatine kinase activity associated with antipsychotic drug treatment. *Neuropsychopharmacology.* 1996; 15(4): 395-405.

- Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Dekeyne A, Newman-Tancredi A, Pasteau V, Rivet JM, Cussac D. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 306: 954-964.
- Modica-Napolitano JS, Lagace CJ, Brennan WA, Aprille JR. Differential effects of typical and atypical neuroleptics on mitochondrial function in vitro. *Arch Pharm Res.* 2003; 26(11): 951-959.
- Mokoena ML, Harvey BH, Viljoen F, Ellis SM, Brink CB. Ozone exposure of Flinders Sensitive Line rats is a rodent translational model of neurobiological oxidative stress with relevance for depression and antidepressant response. *Psychopharmacology (Berl).* 2015; 232(16): 2921-38.
- Morava E, Gardeitchik T, Kozicz T, de Boer L, Koene S, de Vries MC, McFarland R, Roobol T, Rodenburg RJ, Verhaak CM. Depressive behaviour in children diagnosed with a mitochondrial disorder. *Mitochondrion.* 2010; 10(5): 528-533.
- 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.
- Moylan S, Maes M, Wray NR, Berk M. The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. *Mol Psychiatry.* 2013; 18(5): 595-606.
- Mueller TI, Leon AC, Keller MB, Solomon DA, Endicott J, Coryell W, Warshaw M, Maser JD. Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of observational follow-up. *Am J Psychiatry.* 1999; 156: 1000-1006.
- Murray EA, Wise SP, Drevets WC. Localization of dysfunction in major depressive disorder: prefrontal cortex and amygdala. *Biol Psychiatry.* 2011; 69(12):e43-54.
- Nanni V, Uher R, Danese A. Childhood maltreatment predicts unfavorable course of illness and treatment outcome in depression: a meta analysis. *Am J Psychiatry.* 2012; 169(2): 141-51.
- Nemeroff CB, Owens MJ. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci.* 2002; 5: 1068-1070.

- Nemeroff CB. Paradise Lost: The Neurobiological and Clinical Consequences of Child Abuse and Neglect. *Neuron*. 2016; 89(5): 892-909.
- Nestler EJ, Gould E, Manji H, Buncan M, Duman RS, Greshenfeld HK, Hen R, Koester S, Lederhendler I, Meaney M, Robbins T, Winsky L, Zalcman S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry*. 2002; 52(6): 503-28.
- Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*. 2006; 59: 1151-1159.
- Nothdurfter C, Schmotz C, Sarubin N, Baghai TC, Laenger A, Lieb M, Bondy B, Rupprecht R, Schüle C. Effects of escitalopram/quetiapine combination therapy versus escitalopram monotherapy on hypothalamic-pituitary-adrenal-axis activity in relation to antidepressant effectiveness. *J Psychiatr Res*. 2014; 52: 15-20.
- 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.
- Ortmann CF, Réus GZ, Ignácio ZM, Abelaira HM, Titus SE, de Carvalho P, Arent CO, Dos Santos MA, Matias BI, Martins MM, de Campos AM, Petronilho F, Teixeira LJ, Morais MO, Streck EL, Quevedo J, Reginatto FH. Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. *Neurotox Res*. 2016; 29(4): 469-83.
- Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci Lett*. 2010; 479(3): 317-20.
- Pandya CD, Howell KR, Pillai A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 46: 214-23.
- Parikh V, Khan MM, Mahadik SP. Differential effects of antipsychotics on expression of antioxidant enzymes and membrane lipid peroxidation in rat brain. *J Psychiatr Res*. 2003; 37(1): 43-51.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain: stereotaxic coordinates*, 2nd ed. 1986; Academic, San Diego.



- Pittenger C, Duman RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(1): 88-109.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977a; 266(5604): 730-2.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977b; 229(2): 327-36.
- Prieto E, Micó JA, Meana JJ, Majadas S. Neurobiological bases of quetiapine antidepressant effect in the bipolar disorder. *Actas Esp Psiquiatr*. 2010; 38(1): 22-32.
- Prince JA, Yassin MS, Orelund L. Neuroleptic-induced mitochondrial enzyme alterations in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 280(1): 261-267.
- Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Feldon J. Early life stress: long-term physiological impact in rodents and primates. *News Physiol Sci*. 2002; 17: 150-155.
- Raison CL, Rutherford RE, Woolwine BJ, Shuo C, Schettler P, Drake DF, Haroon E, Miller AH. A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA Psychiatry*. 2013; 70(1): 31-41.
- Rasmusson AM, Shi L, Duman R. Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27: 133-142.
- Rawdin BJ, Mellon SH, Dhabhar FS, Epel ES, Puterman E, Su Y, Burke HM, Reus VI, Rosser R, Hamilton SP, Nelson JC, Wolkowitz OM. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav Immun*. 2013; 31: 143-152.
- Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Syrrou M, Papadopoulou-Daifoti Z, Konstandi M. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav Brain Res*. 2013; 244: 29-37.
- Renthal W, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med*. 2008; 14(8): 341-50.

- 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 GZ1, Stringari RB, Ribeiro KF, Ferraro AK, Vitto MF, Cesconetto P, Souza CT, Quevedo J. Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. *Behav Brain Res*. 2011; 221(1): 166-171.
- Réus GZ, Abelaira HM, Santos MAB, Carlessi AS, Tomaz DB, Neottia MV, Liranc,o JLG, Gubertb C, Barth M, Kapczinski F, Quevedo J. Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res*. 2013; 256: 451-456.
- Réus GZ, Abelaira HM, Maciel AL, Dos Santos MA, Carlessi AS, Steckert AV Ferreira GK, De Prá SD, Streck EL, Macêdo DS, Quevedo J. Minocycline protects against oxidative damage and alters energy metabolism parameters in the brain of rats subjected to chronic mild stress. *Metab Brain Dis*. 2015a; 30:545-553.
- 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(11): 1268-81.
- Rezin GT, Cardoso MR, Gonçalves CL, Scaini G, Fraga DB, Riegel RE, Comim CM, Quevedo J, Streck EL. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int*. 2008; 53(6-8):395-400.
- Rezin GT, Gonçalves CL, Daufenbach JF, Fraga DB, Santos PM, Ferreira GK, Hermani FV, Comim CM, Quevedo J, Streck EL. Acute administration of ketamine reverses the inhibition of mitochondrial respiratory chain induced by chronic mild stress. *Brain Res Bull*. 2009; 79(6): 418-421.
- Richelson E, Souder T. Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors focus on newer generation compounds. *Life Sci*. 2000; 68: 29-39.

- Rizzardini M, Lupi M, Mangolini A, Babetto E, Ubezio P, Cantoni L. Neurodegeneration induced by complex I inhibition in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull.* 2006; 69(4): 465-474.
- Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry.* 2002; 7: 609-616.
- Rogóz Z. Combined treatment with atypical antipsychotics and antidepressants in treatment-resistant depression: preclinical and clinical efficacy. *Pharmacol Rep.* 2013; 65(6): 1535-44.
- Romanczuk-Seiferth N, Pöhlend L, Mohnke S, Garbusow M, Erk S, Haddad L, Grimm O, Tost H, Meyer-Lindenberg A, Walter H, Wüstenberg T, Heinz A. Larger amygdala volume in first-degree relatives of patients with major depression. *Neuroimage Clin.* 2014; 5: 62-8.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994; 228(1): 35-51.
- Sacchetti E, Valsecchi P. Quetiapine, clozapine, and olanzapine in the treatment of tardive dyskinesia induced by first-generation antipsychotics: a 124-week case report. *Int Clin Psychopharmacol.* 2003; 18: 357-359.
- Saller CF, Salama AI. Seroquel: biochemical profile of a potential atypical antipsychotic. *Psychopharmacology (Berl).* 1993; 112(2-3): 285-92.
- Sanacora G, Zarate CA, Krystal JH, Manji HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7(5): 426-437.
- Santoro ML, Ota VK, Stilhano RS, Silva PN, Santos CM, Diana MC, Gadelha A, Bressan RA, Melaragno MI, Han SW, Abílio VC, Belangero SI. Effect of antipsychotic drugs on gene expression in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Schizophr Res.* 2014; 157(1-3): 163-8.
- Santos PM, Scaini G, Rezin GT, Benedet J, Rochi N, Jeremias GC, Carvalho-Silva M, Quevedo J, Streck EL. Brain creatine kinase activity is increased by chronic administration of paroxetine. *Brain Res Bull.* 2009; 80(6): 327-330.

- Sapolsky RM. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. *Stress*. 1996; 1:1-19.
- Sarubin N, Nothdurfter C, Schmotz C, Wimmer AM, Trummer J, Lieb M, Uhr M, Baghai TC, Wetter TC, Bühner M, Rupprecht R, Schüle C. Impact on cortisol and antidepressant efficacy of quetiapine and escitalopram in depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; 39: 141-151.
- Sattar SP, Bhatia SC, Petty F. Potential benefits of quetiapine in the treatment of substance dependence disorders. *J Psychiatry Neurosci*. 2004; 29(6): 452-457.
- Savaskan E, Schnitzler C, Schröder C, Cajochen C, Müller-Spahn F, Wirz-Justice A. Treatment of behavioural, cognitive and circadian rest-activity cycle disturbances in Alzheimer's disease: haloperidol vs. quetiapine. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006; 9(5): 507-516.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21:172-188.
- Schmidt HD, Banasr M, Duman RS. Future antidepressant targets: Neurotrophic factors and related signaling cascades. *Drugs Drug Discov Today Ther Strateg*. 2008; 5(3): 151-156.
- Schulte-Herbrüggen O, Chourbaji S, Müller H, Danker-Hopfe H, Brandwein C, Gass P, Hellweg R. Differential regulation of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of learned helplessness. *Exp Neurol*. 2006; 202(2): 404-409.
- Segal M, Avital A, Drobot M, Lukanin A, Derevenski A, Sandbank S, Weizman A. Serum creatine kinase level in unmedicated nonpsychotic, psychotic, bipolar and schizoaffective depressed patients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007; 17(3): 194-198.
- Serretti A, Kato M, De Ronchi D, Kinoshita T. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with selective serotonin reuptake inhibitor efficacy in depressed patients. *Mol Psychiatry*. 2007; 12: 247-257.
- Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. *Rev. Nutr*. 2004; 17(2): 227-236.
- Sheline YI, Waxy P, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:3908-3913.
- Shirayama Y, Chen ACH, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. 2002; 22: 3251-3261.

- Shukla V, Mishra SK, Pant HC. Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci.*, 2011; (2011): p. 572634.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci.* 1995; 15: 1768-1777.
- Spickett CM, Jerlich A, Panasenko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmazyńska T, Schaur RJ. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol.* 2000; 47(4):889-99.
- Stefanescu C, Ciobica A. The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression. *J Affect Disord.* 2012; 143: 34-38.
- Streck EL, Rezin GT, Barbosa LM, Assis LC, Grandi E, Quevedo J. Effect of antipsychotics on succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007; 376(1-2): 127-133.
- Streck EL, Amboni G, Scaini G, Di-Pietro PB, Rezin GT, Valvassori SS, Luz G, Kapczinski F, Quevedo J. Brain creatine kinase activity in an animal model of mania. *Life Sci.* 2008; 82(7-8): 424-429.
- Streck EL, Gonçalves CL, Furlanetto CB, Scaini G, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr.* 2014; 36(2):156-67.
- Sugawara H, Bundo M, Asai T, Sunaga F, Ueda J, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Effects of quetiapine on DNA methylation in neuroblastoma cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015; 56: 117-12.
- Suppes T, Vieta E, Liu S, Brecher M, Paulsson B; Trial 127 Investigators. Maintenance treatment for patients with bipolar I disorder: results from a north american study of quetiapine in combination with lithium or divalproex (trial 127). *Am J Psychiatry.* 2009; 166(4): 476-88.
- Suri D, Veenit V, Sarkar A, Thiagarajan D, Kumar A, Nestler EJ, Galande S, Vaidya VA. Early stress evokes age-dependent biphasic changes in hippocampal neurogenesis, BDNF expression, and cognition. *Biol. Psychiatry.* 2013; 73(7): 658-66.
- Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12(3): 323-5.

- Talarowska M, Szemraj J, Berk M, Maes M, Gaflecki P. Oxidant/antioxidant imbalance is an inherent feature of depression. *BMC Psychiatry*. 2015; 15: 71.
- Tan QR, Wang XZ, Wang CY, Liu XJ, Chen YC, Wang HH, Zhang RG, Zhen XC, Tong Y, Zhang ZJ. Differential effects of classical and atypical antipsychotic drugs on rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007; 17(12): 768-773.
- Tascedda F, Lovati E, Blom JM, Muzzioli P, Brunello N, Racagni G, Riva MA. Regulation of ionotropic glutamate receptors in the rat brain in response to the atypical antipsychotic seroquel (quetiapine fumarate). *Neuropsychopharmacology*. 1999; 21(2): 211-217.
- Todder D, Caliskan S, Baune BT. Night locomotor activity and quality of sleep in quetiapine-treated patients with depression. *J Clin Psychopharmacol*. 2006; 26(6): 638-642.
- Tomaz VS, Cordeiro RC, Costa AM, de Lucena DF, Nobre Júnior HV, de Sousa FC, Vasconcelos SM, Vale ML, Quevedo J, Macêdo D. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neuroscience*. 2014; 268: 236-246.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci*. 2006; 9(4): 519-25.
- Vaccarino V, Brennan ML, Miller AH, Bremner JD, Ritchie JC, Lindau F, Veledar E, Su S, Murrain NV, Jones L, Jawed F, Dai J, Goldberg J, Hazen SL. Association of major depressive disorder with serum myeloperoxidase and other markers of inflammation: a twin study. *Biol Psychiatry*. 2008; 64(6): 476-83.
- Vaidya VA, Siuciak JA, Du F, Duman RS. Hippocampal mossy fiber sprouting induced by chronic electroconvulsive seizures. *Neuroscience*. 1999a; 89:157-166.
- Vaidya VA, Terwilliger RMZ, Duman RS. Role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the stress-induced down-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 1999b; 262: 1-4.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39:44-84

- Valvassori SS, Resende WR, Budni J, Dal-Pont GC, Bavaresco DV, Réus GZ, Carvalho AF, Gonçalves CL, Furlanetto CB, Streck EL, Quevedo J. Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Reverses Behavioral and Mitochondrial Alterations in Animal Models of Depression Induced by Early- or Late-life Stress. *Curr Neurovasc Res.* 2015; 12(4): 312-20.
- van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct.* 2009; 5: 11.
- Vesely C, Kufferle B, Brucke T, Kacper S. Remission of severe tardive dyskinesia in a schizophrenic patient treated with the atypical antipsychotic substance quetiapine. *Int Clin Psychopharmacol.* 2000; 15: 57-60.
- Vieta E, Suppes T, Eggens I, Persson I, Paulsson B, Brecher M. Efficacy and safety of quetiapine in combination with lithium or divalproex for maintenance of patients with bipolar I disorder (international trial 126). *J Affect Disord.* 2008; 109(3): 251-263.
- Wang Y, Chang T, Chen YC, Zhang RG, Wang HN, Wu WJ, Peng ZW, Tan QR. Quetiapine add-on therapy improves the depressive behaviors and hippocampal neurogenesis in fluoxetine treatment resistant depressive rats. *Behav Brain Res.* 2013; 253: 206-211.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004; 7(8): 847-54.
- Weissman MM, Wickramaratne P, Nomura Y, Warner V, Verdeli H, Pilowsky DJ, Grillon C, Bruder G. Families at high and low risk for depression: a 3-generation study. *Arch Gen Psychiatry.* 2005; 62: 29-36.
- Weissman MM, Wickramaratne P, Nomura Y, Tarner V, Pilowsky D, Verdeli H. Offspring of depressed parents: 20 years later. *Am J Psychiatry.* 2006; 163: 1001-1008.
- Williams LM, Debattista C, Duchemin AM, Schatzberg AF, Nemeroff CB. Childhood trauma predicts antidepressant response in adults with major depression: data from the randomized international study to predict optimized treatment for depression. *Transl Psychiatry.* 2016; 6: e799.

- Winter HR, Earley WR, Hamer-Maansson JE, Davis PC, Smith MA. Steady-state pharmacokinetic, safety, and tolerability profiles of quetiapine, norquetiapine, and other quetiapine metabolites in pediatric and adult patients with psychotic disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2008; 18(1): 81-98.
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 1999; 286(5439): 481-486.
- World Health Organization. *The Global Burden of Disease: 2004 Update.* Geneva: WHO; 2008.
- Xu H, Chen Z, He J, Haimanot S, Li X, Dyck L, Li XM. Synergetic effects of quetiapine and venlafaxine in preventing the chronic restraint stress-induced decrease in cell proliferation and BDNF expression in rat hippocampus. *Hippocampus.* 2006;16(6): 551-559.
- Xuan Y, Yan G, Wu R, Huang Q, Li X, Xu H. The cuprizone-induced changes in (1)H-MRS metabolites and oxidative parameters in C57BL/6 mouse brain: Effects of quetiapine. *Neurochem Int.* 2015; 90: 185-92.
- Yan HC, Cao X, Das M, Zhu XH, Gao TM. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull.* 2010; 26(4):327-37.
- Yan LJ, Lodge JK, Traber MG, Matsugo S, Packer L. Comparison between copper-mediated and hypochlorite-mediated modifications of human low density lipoproteins evaluated by protein carbonyl formation. *J Lipid Res.* 1997; 38(5):992-1001.
- Yenilmez D, Atagun MI, Can SS, Caykoylu A. Can Paroxetine Increase Creatine Kinase. *J Mood.* 2014; 4(2): 91-91.
- Zarate CA, Manji HK. The role of AMPA receptor modulation in the treatment of neuropsychiatric diseases. *Exp Neurol.* 2008; 211(1): 7-10.
- Zhang GF, Wang N, Shi JY, Xu SX, Li XM, Ji MH, Zuo ZY, Zhou ZQ, Yang JJ. Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013; 110: 8-12.
- Zhang Y, Wang Y, Wang L, Bai M, Zhang X, Zhu X. Dopamine Receptor D2 and Associated microRNAs Are Involved in Stress Susceptibility and Resistance to Escitalopram Treatment. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015; 18(8). pii: pyv025.



- Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J Neurochem.* 2007; 103(5): 1843-54.
- Zugno AI, Barcelos M, Oliveira Ld, Canever L, Luca RD, Fraga DB, Matos MP, Rezin GT, Scaini G, Búrigo M, Streck EL, Quevedo J. Energy metabolism, leptin, and biochemical parameters are altered in rats subjected to the chronic administration of olanzapine. *Rev Bras Psiquiatr.* 2012; 34(2): 168-175.