



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**Francis Leonardo Pazini**

**Vias de sinalização implicadas no efeito tipo-antidepressivo  
induzido pela administração aguda de creatina e cetamina em um  
modelo de depressão**

**Florianópolis, novembro de 2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pazini, Francis Leonardo Pazini

Vias de sinalização implicadas no efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração aguda de creatina e cetamina em um modelo de depressão / Francis Leonardo Pazini Pazini ; orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues Rodrigues - Florianópolis, SC, 2013.

151 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

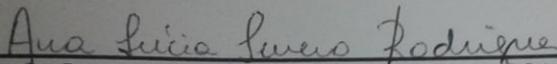
1. Bioquímica. 2. Creatina. 3. Cetamina. 4. Antidepressivos rápidos em modelos de depressão. 5. teste preditivo de suspensão pela cauda . I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo Rodrigues . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

“Vias de sinalização implicadas no efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração aguda de creatina e cetamina em um modelo de depressão”  
por

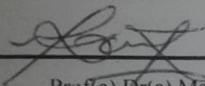
**Francis Leonardo Pazini**

Dissertação julgada, e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 26/PPGBQA/2013) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

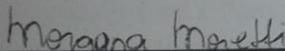
**Banca Examinadora:**



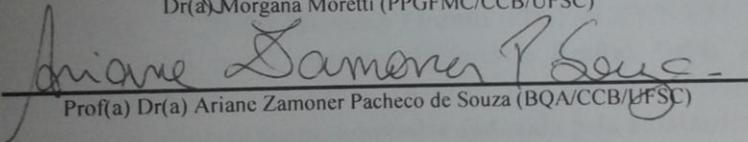
Prof(a) Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues (Orientadora/BQA/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Mânuela Pinto Kaster (BQA/CCB/UFSC)

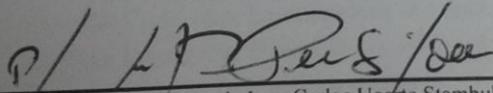


Dr(a) Morgana Moretti (PPGFMC/CCB/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza (BQA/CCB/UFSC)

**Coordenador do Programa:**



Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 22 de novembro de 2013.



*Dedico esta dissertação aos meus pais e ao tio Sinho*



## AGRADECIMENTOS

É difícil escrever essas linhas, não sou muito bom com as palavras, mas gostaria que cada pessoa que se importou e colaborou com a realização e desenvolvimento desse projeto ganhasse atenção especial e compartilhasse desse momento feliz.

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais Nelci e Elvira, e ao meu tio "Sinho" pelo apoio (\$\$\$), sem a paciência e confiança de vocês eu não teria conseguido. Uma agradecimento especial à Gio (mais nova mamãe do pedaço) e ao Beto, à Silvana e ao Júlio pelos inúmeros finais de semana regados a muita cerveja e risadas e ao Simão e o Marco pela companhia no video game, vocês são maravilhosos!

À minha mãe, em especial, que foi uma psicóloga maravilhosa, que mesmo longe, sempre esteve por perto, me apoiando quando eu mais precisava. Eu sei que você sofreu bastante pra conseguir que seus filhos chegassem à faculdade e eu quero que saiba que vou fazer de tudo pra que tenha valido a pena, e que você não tenha se privado de nada em vão. Nos momentos em que eu queria desistir, tu me deste ânimo e belas palavras, não tenho como expressar a minha admiração por esta guerreira, quero que você saiba que esta conquista é sua!

Ao tio mais legal desse mundo, o tio Sinho, agradeço imensamente pela parceria incrível, pela figura humana singular e exemplar. Quero que você saiba que seu apoio foi determinante para a conclusão desta etapa, e que não tem como esquecer as coisas maravilhosas que você sempre fez por mim. Marotagens, boas risadas, as pescarias, viagens, as semanas dos inúmeros Natais, enfim, não tem explicação a maneira como o tempo voa quando estamos juntos. Para

mim, uma frase resume tudo: "*amigos para sempre é o que nós iremos ser*".

À minha irmã Silvana pelas conversas intermináveis, conselhos, caronas e pelo contrabando de comida quase todo santo final de semana, um dia eu juro que devolvo em dobro!!

À minha namorada Anelise, que esta pagando todos os pecados desse mundo por me aguentar nesses dias difíceis ao meu lado. Te prometo uma Ferrari e uma casa da Praia em Búzios (kkkk jura), porque você merece isso tudo e muito mais. Essa foi talvez uma das pessoas que mais me surpreendeu até hoje. Sempre disposta a me ajudar de todas as maneiras (e me tirando do sério em muitas outras, hehe) sempre demonstrou interesse no que eu fazia no laboratório, sempre com aquele jeitinho meigo de dizer que entendia essas loucuras, mesmo eu sabendo que ela não entendia nada. Mesmo porquê, ninguém entende mesmo essa tal de Bioquímica... Seu apoio e carinho incondicional foram muito importantes pra mim, eu te amo muito, você é a mulher da minha vida.

Aos amigos do laboratório, em especial ao Maurício, praticamente meu irmão mais velho. Esse guri foi uma das pessoas mais doidas que eu conheci na vida, e que despertaram em mim o amor pela ciência, ele mostrou que valia a pena se dedicar à pesquisa e que isso não precisava ser cansativo ou maçante, mas que podia ser divertido (embora eu ainda vou me vingar por ficar contando campo aberto a -80 °C na sala de comportamento). Obrigado por contribuir com o meu crescimento profissional e pessoal, você é a figura *inshxpiradora maishx* divertida desse mundo, um grande amigo!

À Julia eu tenho mesmo é que agradecer pela paciência de ficar ouvindo os meus *mimimis* horas e horas. A Julia é uma amiga que

sempre sabe o que falar na hora que você precisa ouvir uma verdade, embora essas verdades as vezes são "beeeem" diretas. Parceira de natação, é uma figura extremamente prestativa, que cativa todos ao seu redor, e com um gosto musical espetacular, obrigado pelas músicas. Sempre esteve disposta a me ajudar no que eu precisava, é uma amiga que levarei para a vida.

Não poderia deixar de deixar o meu agradecimento à Ágatha (acertei o H do seu nome!!!) que foi minha companheira de laboratório desde a minha entrada na Família Laned. Passamos por muitas coisas boas e altamente estressantes juntos, como a seleção de mestrado e a nossa qualificação, e conseguimos juntos muitas conquistas também. Te desejo muita boa sorte nessa sua nova caminhada =/ !!

Agradeço ao Vicente pela amizade verdadeira e pelas piadas que até hoje eu não entendo direito. O Vicente é uma figura de extremo bom coração, e que está sempre disposto a auxiliar todo mundo. Obrigado pelos "helps" nos experimentos e pelo compartilhamento de torrents de jogos nas horas vagas!

À galera do Laned deixo meus sinceros agradecimentos. À Vivi pela eterna implicância com a minha leve desorganização, e pela fofura dos seus emails e da sua pessoa. A Vivi é incrível na sua incansável luta para que todos adotem um cãozinho ou gatinho de rua, sem dúvida é uma pessoa bondosa e generosa, mas mesmo assim não vai me convencer a não esganar o Buba. Ao Colla, pelo cafezinho maravilhoso toda hora e pelas milhares de horas e horas de discussões sobre o modelo da corticosterona. Uma figura excepcional, sempre crítica, mas com uma péssima pontaria no paintball! Ao Luis um guri de ótimo coração, mas que insiste em se pagar de metaleiro malvado. Espero que

um dia eu consiga convencê-lo a cuidar das crianças pobrezinhas na África em vez dele ficar apostando na bolsa de valores. Ao Giordano Leprechaun pelo tempo que passou no Laned, e pelas dicas e boas risadas que demos, incomodando praticamente todo o prédio da Bioquímica. À Luana por incansavelmente tentar me levar para o caminho da boa alimentação, obviamente sem sucesso. Prometo que um dia eu começo a colocar menos açúcar no café, embora eu ainda tenho aquela foto de você comendo uma coxinha!! À Priscila pelos desenhos que enriqueceram a apresentação dessa dissertação e pela implicância de brigar comigo por causa do açúcar fora do lugar. Esses momentos foram muito engraçados, espero ter outros milhares de momentos assim. À Camille (não Camila) pelas dicas na execução do Blotting sempre com muito carinho e delicadeza, do tipo: "cara mas tu é muito lerdo!". Agradeço também à Morgana, Anna, Patrícia, Manu, Gianni, Marcão pelas risadas e discussões, sempre muito agradáveis. Esses dois anos foram maravilhosos, vocês são sensacionais!

À chefe mais legal desse mundo (*puxa-saco detected*) Ana Lúcia. Ainda lembro do dia em que ela me parou na rua me oferecendo uma vaga no Laned, foi um momento que mudou a minha vida. Uma pessoa extremamente competente, carismática, que realiza seu trabalho com um amor e carinho sem igual. É praticamente uma mãe para todos os seus alunos. Pode-se dizer que nasceu pra fazer o que faz, e faz o que gosta com muita dedicação.

Aos meus amigos de república James e André, pelas noites intermináveis fazendo muito barulho, ouvindo música alta e incomodando todo mundo, principalmente o Igor e o Fernando, que por sinal são grandes figuras e que agradeço muito pelo companheirismo.

Nossas jantas, filmes, giros pelo Facebook e reuniões sobre capitalismo, liberalismo, socialismo, anarquismo e outros ismos ficarão na lembrança com muito carinho.

À Daniele Sporck, à Cristina Copetti, à Marina Steiner, à Jaqueline Casagrande, à Juliane Viana e ao Rafael Mafetoni, que me apoiaram incondicionalmente no ingresso ao mestrado, e que sempre me presentearam com demonstrações de amizade e companheirismo. Guardo boas lembranças e desejo muita sorte na caminhada de vocês.

Gostaria de agradecer ao meu velho amigo Ricardo (*in memoriam*), que partiu deixando saudades. Desejo muita paz e serenidade, onde quer que você esteja, espero que tenha se encontrado.

À Capes pelo apoio financeiro e ao RU por não me deixar morrer de fome nesses dois anos que passaram.



*- "O problema do mundo de hoje é que as  
pessoas inteligentes estão cheias de dúvidas, e  
as pessoas idiotas estão cheias de certezas..."  
(Charles Bukowski)*

*- "O que me preocupa não é o grito dos maus.  
É o silêncio dos bons."  
(Martin Luther King -usada em um discurso-)*

*- "Você nunca sabe a força que tem, até que a  
sua única alternativa é ser forte."  
(?)*



## RESUMO

A creatina é um composto sintetizado endogenamente e também obtido pela dieta, intimamente relacionado com o metabolismo energético muscular e cerebral que possui efeito anti-excitotóxico, antioxidante e neuroprotetor, além de apresentar atividade antidepressiva em estudos pré-clínicos e clínicos. O tratamento da depressão ainda é desafiador tendo em vista as limitações dos fármacos atualmente disponíveis no mercado. Uma nova estratégia para o tratamento da depressão refratária a tratamentos convencionais consiste na utilização de cetamina, um antagonista de receptores NMDA que age de forma rápida e eficiente. Este estudo investigou em camundongos *Swiss*, de forma comparativa, os efeitos antidepressivos da creatina e da cetamina e a participação da via PI3K/Akt/mTOR neste efeito. Para isso, utilizamos um modelo de indução de comportamento tipo-depressivo por meio da administração crônica de corticosterona nesses animais. A administração oral de corticosterona (20 mg/kg, p.o.) por 21 dias, mas não por 7 e 14 dias, promoveu um aumento no tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão pela cauda (TSC) e uma diminuição no tempo de comportamento de auto-limpeza no teste de borrifagem de sacarose (*splash teste*), caracterizando um comportamento tipo-depressivo. O aumento no tempo de imobilidade no TSC induzido pelo modelo de depressão foi revertido pelo tratamento com creatina (10 mg/kg, p.o.) e por cetamina (1 mg/kg, i.p.), mas não por fluoxetina (10 mg/kg, p.o.), quando administradas uma única vez, 24 horas após a última administração de corticosterona. Adicionalmente, os animais submetidos ao modelo de depressão apresentaram uma redução na

concentração sérica de corticosterona comparado ao grupo controle sendo que este parâmetro não foi alterado pelo tratamento com creatina (10 mg/kg, p.o.) ou cetamina (1 mg/kg, i.p.). Adicionalmente foi demonstrado que o tratamento dos camundongos com wortmanina (um inibidor irreversível de PI3K, 0,1 µg/sítio, i.c.v.), ou rapamicina (um inibidor de mTOR, 0,2 nmol/sítio, i.c.v.), reverteram o efeito anti-imobilidade da creatina (10 mg/kg, p.o.) e da cetamina (1 mg/kg, i.p.) no TSC, tanto em animais submetidos ao modelo de depressão, quanto nos animais tratados com veículo. Nenhuma alteração locomotora dos animais foi observada no teste do campo aberto, em nenhum dos grupos experimentais. Adicionalmente investigamos o efeito da creatina e da cetamina sobre os níveis de mTOR fosforilada e total no hipocampo. Tanto os animais tratados com creatina (10 mg/kg, p.o.) quanto os animais tratados com cetamina (1 mg/kg, i.p.) apresentaram um aumento no imunoconteúdo de p-mTOR (Ser<sup>2481</sup>), tanto nos grupos experimentais submetidos ao tratamento crônico com corticosterona, quanto nos grupos controle. O conjunto de resultados indica que a creatina compartilha com a cetamina um efeito tipo-antidepressivo agudo em um modelo animal de depressão classicamente responsivo apenas à administração crônica de antidepressivos. Esse efeito parece ser mediado pela ativação da via de sinalização mediada por PI3K/Akt/mTOR. Dessa maneira pode-se sugerir que a creatina pode constituir uma alternativa terapêutica de efeito antidepressivo rápido, com efeitos adversos menos pronunciados quando comparada com a cetamina, para o tratamento da depressão associada ao estresse.

**Palavras chave:** creatina, depressão, cetamina, estresse, corticosterona, teste de suspensão pela cauda, via PI3K/Akt/mTOR.



## ABSTRACT

Creatine is an endogenous compound synthesized either by our organism or obtained by the diet that plays a key role in muscle and brain energetic metabolism. Besides possessing antiexcitotoxic, antioxidant and neuroprotective properties, it has antidepressant effects in preclinical and clinical studies. The management of depression still represents a challenge, especially due to the limitations of the therapeutic options available in the market. Ketamine, an antagonist of NMDA receptors, has been successfully used as a novel strategy for the treatment of refractory depression, producing rapid and efficient remission. This study investigated the antidepressant effects of creatine, compared with ketamine and the involvement of PI3K/Akt/mTOR pathway in their effects in a model of depression induced by the chronic administration of corticosterone in Swiss mice. The oral administration of corticosterone (20 mg/kg, p.o.) for 21 days, but not for 7 or 14 days caused an increased immobility time in the tail suspension test (TST) and a reduction in the time spent grooming in the *splash test*, indicative of a depressive-like behavior. The increased immobility time induced by the depression model was reversed by either creatine (10 mg/kg, p.o.) or ketamine (1 mg/kg, i.p.) treatment, but not by a single dose of fluoxetine (10 mg/kg, p.o.), administered once, 24 h after the last administration of corticosterone. Additionally, mice submitted to the depression model presented a reduction on the serum corticosterone levels as compared to the control group. This parameter was not altered neither by creatine nor ketamine treatment. Moreover, treatment of mice with either wortmannin (irreversible PI3K inhibitor, 0.1 µg/site, i.c.v.), or

rapamycin (mTOR inhibitor, 0.2 nmol/site, i.c.v.), abolished the anti-immobility effect of creatine (10 mg/kg, p.o.) and ketamine (1 mg/kg, i.p.) in the TST both in mice submitted to chronic administration of corticosterone and in control mice. None of the treatments caused any alteration in the locomotor activity of mice in the open-field test. Additionally, the effects of creatine and ketamine on the levels and phosphorylation of mTOR were investigated. The immunoccontent of p-mTOR (Ser<sup>2481</sup>) was increased both in mice treated with creatine (10 mg/kg, p.o.) and ketamine (1 mg/kg, i.p.) from corticosterone and vehicle groups. Altogether, the results indicate that creatine shares with ketamine the ability to acutely reverse the depressive-like behavior induced by a model of depression that does not respond to acute fluoxetine administration in mice. This effect seems to be mediated by the activation of PI3K/Akt/mTOR signaling. Therefore, it may be suggested that creatine might be a novel antidepressant compound with a robust and rapid onset of action, comparable to ketamine due devoid of its strong psychotropic effects.

**Keywords:** creatine, depression, ketamine, stress, corticosterone, tail suspension test, PI3K/Akt/mTOR pathway.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Imagem estrutural dos enantiômeros S(+) e R(-) da cetamina (esquerda e direita, respectivamente).....	43
<b>FIGURA 2.</b> Cetamina aumenta a atividade da mTOR e sinaptogênese.....	46
<b>FIGURA 3.</b> Cetamina aumentando a densidade sináptica.....	49
<b>FIGURA 4.</b> Fórmula estrutural da creatina .....	51
<b>FIGURA 5:</b> Esquema de síntese de creatina em mamíferos.....	53
<b>FIGURA 6:</b> Esquema de síntese de creatina no encéfalo.....	54
<b>FIGURA 7:</b> Sistema creatina/fosfocreatina e papel neuromodulador...59	
<b>FIGURA 8:</b> Esquema de tratamento para investigação do melhor período de tratamento crônico com corticosterona para indução do comportamento tipo-depressivo.....	72
<b>FIGURA 9:</b> Esquema de tratamento para investigação do efeito agudo da creatina, fluoxetina e cetamina.....	73
<b>FIGURA 10:</b> Esquema de tratamento para investigação da via PI3K/Akt/mTOR no efeito agudo da creatina e da cetamina no modelo de corticosterona.....	74
<b>FIGURA 11:</b> Teste de Suspensão pela Cauda (TSC).....	75
<b>FIGURA 12:</b> Teste do Campo Aberto (TCA).....	76
<b>FIGURA 13:</b> Teste de Borrifagem de sacarose ( <i>splash test</i> ).....	77
<b>FIGURA 14.</b> Curva de tempo-reposta do tratamento crônico por 7, 14 e 21 dias de corticosterona ou veículo no TSC e no TCA.....	82
<b>FIGURA 15.</b> Curva de tempo-reposta do tratamento crônico por 7, 14 e 21 dias com corticosterona ou veículo no <i>splash test</i> .....	83

<b>FIGURA 16.</b> Efeito do tratamento agudo com creatina, cetamina e fluoxetina no TSC e no TCA após 21 dias de tratamento crônico com corticosterona ou veículo.....	85
<b>FIGURA 17.</b> Efeito do tratamento com wortmanina na ação tipo-antidepressiva da creatina no TSC, e sobre a locomoção no TCA em animais tratados cronicamente com veículo ou corticosterona por 21 dias.....	87
<b>FIGURA 18.</b> Efeito do tratamento com wortmanina na ação tipo-antidepressiva da cetamina no TSC, e sobre a locomoção no TCA em animais tratados cronicamente com veículo ou corticosterona por 21 dias.....	89
<b>FIGURA 19.</b> Efeito do tratamento com rapamicina na ação tipo-antidepressiva da creatina no TSC, e sobre locomoção no TCA em animais tratados cronicamente com veículo ou corticosterona por 21 dias.....	91
<b>FIGURA 20.</b> Efeito do tratamento com rapamicina na ação tipo-antidepressiva da cetamina no TSC, e sobre locomoção no TCA em animais tratados cronicamente com veículo ou corticosterona por 21 dias.....	93
<b>FIGURA 21.</b> Efeito do tratamento com creatina e cetamina, sobre os níveis de corticosterona em animais submetidos ao tratamento crônico por 21 dias com veículo ou corticosterona.....	94
<b>FIGURA 22.</b> Efeito do tratamento com creatina e cetamina sobre o imunconteúdo de p-mTOR no modelo de depressão induzido por 21 dias de tratamento com corticosterona.....	96

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1.</b> . Critérios para se diagnosticar um paciente com depressão segundo diretrizes do manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV).....	35
--	----



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

a.C- antes de Cristo

AKT- proteína cinase B (PKB)

AMPA- ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ANOVA- análise de variância

ATP- trifosfato de adenosina

Bcl2- linfoma de células B 2

BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo

CCVD- canais de cálcio dependente de voltagem

CET- cetamina

CNQX- 6-ciano-7-nitroquinoxalino-2,3-diona

CORT- corticosterona

CRE- creatina

DMSO- dimetilsulfóxido

DNQX- 6,7-dinitroquinoxalino-2,3-diona

DO- densidade óptica

DSM IV- Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais- 4<sup>o</sup> edição

4E-BP- proteína ligante 4E

E.P.M.- erro padrão da média

ECI- estresse crônico imprevisível

eEF2K- cinase de fator de alongamento eucariótico 2

FLK1- receptor de VEGF

GLUR- subunidade 1 de receptores glutamatérgicos AMPA

5-HT- serotonina

i.c.v. - intracerebroventricular

i.p.- intraperitoneal

iMAO- inibidores da monoamina oxidase

ISRS- inibidor seletivo da recaptção de serotonina

mGLU2- receptor metabotrópico do tipo 2

mGLU5- receptor metabotrópico do tipo 5

mTOR- proteína alvo de rapamicina em mamíferos

mTORC1- complexo I da proteína alvo de rapamicina em mamíferos

NBQX- 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo [f] quinoxalina-2,3-diona

NMDA- N-metil-D-aspartato

p.o. - *per oral* (via oral)

p70S6K- cinases ribossomais S6 de 70 kDa

PDK1- proteína cinase dependente de fosfatidilinosítídio 1

PI3K- fosfatidilinositol 3'cinase

PKB- proteína cinase B (AKT)

Pras 40- substrato de AKT rico em prolina de 40 kDa

PSD95- proteína de densidade sináptica de 95 kDa

SNC- sistema nervoso central

TCA- teste do campo aberto

TNF- teste do nado forçado

trkB- tropomiosina cinase B

TSC- teste de suspensão pela cauda

VEGF- fator de crescimento vascular endotelial

VEÍ- veículo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
1.1. HISTÓRICO DA DEPRESSÃO E SEU TRATAMENTO.....	29
1.2. DEPRESSÃO: PREVALÊNCIA, SINTOMAS, ETIOLOGIA E TRATAMENTO.....	33
1.3. O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	39
1.4. CETAMINA E A VIA mTOR.....	42
1.5. A CREATINA.....	49
1.6. MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO.....	61
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>65</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	67
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	67
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
4.1. ANIMAIS.....	69
4.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTO.....	69
4.2.1. Investigação do comportamento tipo-depressivo induzido pela administração crônica de corticosterona.....	71
4.2.2. Investigação do efeito agudo da cetamina, da creatina e da fluoxetina no modelo de depressão induzido por corticosterona.....	72
4.2.3. Investigação da participação da via PI3K/Akt/mTOR.....	73
4.3. TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA (TSC).....	74
4.4. TESTE DO CAMPO ABERTO (TCA).....	75
4.5. TESTE DE BORRIFAGEM DE SACAROSE.....	76
4.6. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING.....	77

4.7. ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA.....	79
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
5.1. Investigação do comportamento tipo-depressivo induzido pela administração crônica de corticosterona .....	81
5.2. Efeito da administração aguda de creatina, cetamina e fluoxetina no modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por corticosterona no TSC e na atividade locomotora no TCA .....	83
5.3. Envolvimento da via PI3K/AKT no efeito antidepressivo da creatina e da cetamina no modelo de depressão induzido por corticosterona .....	86
5.4. Envolvimento da via mTOR no efeito antidepressivo da creatina e da cetamina no modelo de depressão induzido por corticosterona.....	90
5.5. Efeito da administração aguda de creatina e cetamina sobre os níveis de corticosterona no soro de animais submetidos ao tratamento crônico com corticosterona .....	94
5.6. Alterações no imunoconteúdo de mTOR no tratamento com creatina e cetamina no modelo de depressão induzido por corticosterona.....	95
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>113</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>115</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HISTÓRICO DA DEPRESSÃO E SEU TRATAMENTO

A depressão faz parte do cotidiano do ser humano há muito tempo, existindo relatos de casos que remontam há mais de mil anos antes de Cristo, com inscrições inclusive em textos bíblicos. Curiosamente, no livro I de Samuel (século IX a.C.) aparece o primeiro relato de um possível caso de depressão. Nesta passagem, o rei Saul, teria sido destituído de seu trono pelo seu pai, devido a sua péssima conduta administrativa como soberano. Em virtude deste episódio, conta-se que o rei Saul passara a ser assediado por diversos demônios, por meio do que se relatava ser uma "tristeza profunda" (ESTEVES e GALVAN, 2006; VIEIRA, 2008).

Relatos como este vêm sendo contados por meio de clássicos da literatura no decorrer da História. No século VIII a.C., na obra "Ilíada", o escritor grego Homero narra em alguns de seus versos o sofrimento espiritual do guerreiro Ájax, que em virtude de um erro cometido durante a Guerra de Tróia, é tomado por intenso sentimento de culpa e buscando aliviar o sofrimento pelo qual estava passando, resolveu acabar com a própria vida (ESTEVES e GALVAN, 2006; VIEIRA, 2008).

Durante os séculos seguintes, diversos pensadores tentaram explicar esta tão intrigante doença. No século IV a.C., Hipócrates, considerado pai da medicina, tentou explicar por meio do acúmulo de fluídos corporais ("bílis negra"), o aparecimento de estados de melancolia. Na sua definição, "melancolia se referia à perda de amor à

vida, uma situação em que o indivíduo aspira a morte como se fosse uma benção" (TEIXEIRA, 2005; GONÇALES e MACHADO, 2007). Curiosamente, a palavra melancolia é derivada do grego *melas* (negro) e *kholé* (bile) correspondendo a transliteração latina *melaina-kole* (TEIXEIRA, 2005). As teorias envolvendo um desequilíbrio desses fluidos corporais permaneceram através dos séculos, propagadas por outros filósofos como Galeno, Oribésius de Pergamon, Alexandre de Tralles, Paulo de Aegina, e escritores de origem árabe como Constantinus, Africanus e Avicenne. No entanto, não houve grandes avanços na área científica relacionada tanto à etiologia da depressão quanto também às formas de tratamento, estas rudimentares e sem significado clínico algum (WONG e LICÍNIO, 2001).

Apenas em 1854, Falret e Baillarger, dois médicos franceses muito conhecidos na época, publicaram os primeiros diagnósticos formais do que consideravam ser episódios alternantes de mania e depressão, através dos termos *Folie Circulare* ("loucura circular") (DUBOVISKY e DUBOVISKY, 2004). Entretanto, apenas em 1893 a depressão foi referida como um transtorno, por Emil Kraepelin, no seu sistema nosológico de classificação de transtornos psiquiátricos (WONG e LICÍNIO, 2001).

As tentativas de se entender esse transtorno sempre caminharam paralelamente com os esforços em se tentar abordagens antidepressivas mais eficientes, sendo estas farmacológicas ou não. Inicialmente a terapia proposta era rudimentar e até certo ponto duvidosa, com massagens, ginástica, eméticos, purgativos e sangrias fazendo parte das estratégias antidepressivas (GONÇALES e MACHADO, 2007). Somente em 1950 deu-se um passo fundamental no tratamento da

depressão, com a descoberta de que a reserpina (um anti-hipertensivo que provocava depleção de noradrenalina) causava como efeito secundário a depressão maior. Pesquisas demonstraram que um precursor de dopamina e noradrenalina, L-DOPA, revertia estes efeitos, tanto em homens quanto em animais. Desta maneira, mostrava-se a importância fundamental das aminas biogênicas no transtorno de depressão maior, revelando-as como um importante alvo terapêutico (LICÍNIO *et al.*, 2007).

Em 1953, tratando pacientes com tuberculose, descobriu-se ao acaso que a iproniazida (um antituberculínico), melhorava o humor de pacientes depressivos. O mecanismo de ação da iproniazida consistia na inibição da enzima monoamina oxidase, responsável pela degradação das monoaminas serotonina, noradrenalina e dopamina (NESTLER *et al.*, 2002). Alguns anos mais tarde, desenvolveram-se outros inibidores desta enzima, com o objetivo de tratar a depressão, como a meclobemida e a tranilcipromina. Os efeitos adversos destes inibidores eram consideráveis (estimulação excessiva, euforia e hepatotoxicidade), o que sempre motivou pesquisadores, indústrias farmacêuticas e psicoterapeutas a buscarem novas alternativas de tratamento. Em 1954, o psiquiatra suíço Roland Kuhn, descobriu então a imipramina, que não tinha os efeitos colaterais dos fármacos citados, e apresentava uma eficácia de até 60% dos casos de depressão. Visando os expressivos lucros da venda deste medicamento, a empresa Geigy colocou a imipramina no mercado, obtendo grande adesão ao seu uso, bem como grandes cifras. Este grupo de compostos, pela sua estrutura química característica com 3 anéis cíclicos, ficou conhecido como antidepressivos tricíclicos, e atualmente ainda são usados no tratamento

da depressão, representado principalmente pela amitriptilina, nortriptilina, clomipramina, imipramina e pela desipramina (NESTLER *et al.*, 2002).

Mas o grande avanço no tratamento da depressão ainda estava por vir. Em 1970, o neurofarmacologista americano David Wong demonstrou que existiam alguns fármacos, especificadamente da classe das butilferonas, que atuavam basicamente sobre o metabolismo da serotonina (5-HT) e isso revolucionou a maneira como os transtornos de humor eram tratados. Wong descobriu que substâncias que inibiam seletivamente a recaptção de 5-HT no cérebro apresentavam um potencial terapêutico expressivo em transtornos depressivos. Com isto veio a tona a teoria clássica da depressão, na qual se tem uma correlação direta entre desregulação monoaminérgica e depressão (WONG e LICÍNIO, 2001).

Embora o sucesso dos inibidores seletivos da recaptção de 5-HT (ISRS), encabeçado principalmente pela fluoxetina e pela sertralina, seja expressivo, a corrida pelo desenvolvimento de novos fármacos aumenta exponencialmente, porém sem grandes inovações. Contudo, novos alvos moleculares estão sendo propostos na tentativa de encontrar estratégias terapêuticas mais eficazes para esta doença, bem como a compreensão da fisiopatologia da doença. Dentre estas inovações, destacam-se as pesquisas relacionadas com a modulação glutamatérgica da via mTOR, e principalmente as ações da cetamina como antidepressivo de ação rápida.

## **1.2. DEPRESSÃO: PREVALÊNCIA, SINTOMAS, ETIOLOGIA E TRATAMENTO**

A depressão maior se encontra entre os maiores problemas de saúde pública do mundo, causando uma considerável morbidade psiquiátrica e perda de produtividade (NESTLER e CARLEZON, 2006). Estima-se que a taxa de prevalência da depressão e dos transtornos de humor relacionados ao estresse na vida de um indivíduo esteja em torno de 17%, resultando em um enorme sofrimento pessoal, social e de alto custo financeiro (DUMAN e VOLETI, 2012). Além disso, pacientes que sofrem de depressão severa apresentam altas taxas de mortalidade e comorbidades, destacando-se doenças coronarianas, isquemia cerebral comorbidades psiquiátricas principalmente relacionadas a transtornos de ansiedade além de estar associada com elevado risco de suicídio (NEMEROFF, 2007).

A depressão é caracterizada na maioria das vezes por anedonia (perda de interesse ou prazer nas atividades diárias, que antes eram prazerosas) e humor deprimido. Outros sintomas, altamente variáveis e contrastantes, podem incluir perturbações do sono, ganho ou perda de peso, aumento ou diminuição do apetite, sentimentos recorrentes ou inapropriados de culpa, agitação psicomotora, diminuição da capacidade de pensar, de concentração, de tomar decisões e pensamentos recorrentes de morte ou suicídio. O Manual Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) define a depressão com um episódio depressivo caracterizado por manifestações por um período superior a duas semanas de 5 ou mais sintomas dos citados acima e exigindo que dentre esses sintomas, anedonia ou humor deprimido estejam presentes

(**Tabela 1**) (DSM-IV-TR, 2000). Ademais acredita-se que múltiplos transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão, provavelmente reflitam diversas patogêneses induzindo uma ampla gama de sintomas depressivos (LOFTIS *et al.*, 2010), o que torna complexo o conhecimento dos seus mecanismos fisiopatológicos e em consequência disto, dificulta a descoberta de novos fármacos antidepressivos.

A natureza heterogênea da depressão sugere o envolvimento de múltiplas regiões cerebrais na fisiopatologia desta doença. Evidências crescentes tem demonstrado que estas regiões podem estar agindo como mediadores desta diversidade de sintomas. Através de estudos com neuroimagem, observou-se o envolvimento principalmente do hipocampo e do córtex pré-frontal, possivelmente associados às disfunções cognitivas presentes no transtorno. Da mesma forma os aspectos motivacionais da depressão, como a anedonia, têm sido relacionados a anormalidades no núcleo accumbens assim como alterações de sono e apetite no hipotálamo (DREVETS, 2001; MAYBERG, 2003).

Muitos estudos sugerem que os sintomas da depressão estão relacionados com uma redução na plasticidade sináptica cerebral (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; DUMAN *et al.*, 2012). Esta menor plasticidade dos circuitos neuronais em indivíduos deprimidos está também associada a modificações morfológicas no córtex límbico, com destaque para uma diminuição da arborização dendrítica e do número de contatos sinápticos, evidenciado também por uma menor expressão de proteínas sinápticas (MAGARIÑOS e MCEWEN,1995; MAGARIÑOS *et al.*, 1997). Paralelamente ocorre também uma atrofia em particular do

**Tabela 1. Critérios para se diagnosticar um paciente com depressão segundo diretrizes do manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV).**

---

1- Humor deprimido

2- Anedonia

---

3- Falta de esperança, desespero, sentimento de culpa ou desvalia

4- Distúrbios alimentares relacionados ao ganho ou perda de peso

5- Agitação psicomotora ou letargia

6- Fadiga ou falta de energia

7- Pensamentos recorrentes de morte ou tentativa de suicídio

8- Dificuldade de concentração

9- Distúrbios do sono, insônia ou hipersônia

---

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994).

hipocampo (SHELIN *et al.*, 1996), com prejuízo dos mecanismos de neuroplasticidade, incluindo redução da neurogênese, da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Bcl2) acompanhada de aumento das pró-apoptóticas (Bax, Bad), e principalmente diminuição dos níveis de fatores neurotróficos, como o derivado do encéfalo (BDNF) (NESTLER *et al.*, 2002). De fato a exposição dos animais a agentes estressores, farmacológicos ou não, é capaz de induzir uma série de alterações fisiológicas e comportamentais que mimetizam o estado depressivo, podendo ser revertidas pelo tratamento crônico com antidepressivos (WILLNER *et al.*, 1992; D'AQUILA *et al.*, 1994; WILLNER, 1997, GUTIÉRREZ-GARCÍA e CONTRERAS, 2008).

Entre as causas da depressão o fator hereditário tem uma influência significativa, uma vez que aproximadamente 30-40% do risco de desenvolver o transtorno tem influência genética. O restante dessa porcentagem varia desde causas ambientais, incluindo traumas de

infância (abuso sexual), estresse emocional, até mesmo "doenças físicas" (hipotireoidismo, Síndrome de Cushing) (BERTON e NESTLER, 2006; CASPI *et al.*, 2010; DICK *et al.*, 2010).

É bem validado que a depressão é uma doença relacionada ao estresse, uma vez que este pode comprometer sistemas neuroquímicos e morfológicos contribuindo para o risco de depressão (NESTLER *et al.*, 2002). Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes, principalmente de origem psicossocial (POST, 1992). O estresse crônico é um fator ambiental que pode levar ao aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides, desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e a consequente morte de neurônios hipocampais (NESTLER *et al.*, 2002), sendo estes neurônios amplamente relacionados às funções cognitivas (SAPOLSKY, 2000). Nestas condições há um prejuízo dos mecanismos de neuroplasticidade, incluindo redução da neurogênese, os quais são revertidos após o tratamento com antidepressivos (NESTLER *et al.*, 2002; PITTENGER e DUMAN, 2008).

Contudo, a etiologia da depressão ainda não está completamente elucidada, embora haja consenso de que a doença resulte, em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica no encéfalo (ELHWUEGI, 2004). A hipótese monoaminérgica da depressão surgiu em 1965, postulando que essa doença podia ser consequência de uma redução dos níveis de monoaminas na fenda sináptica e que o tratamento da depressão envolvia um aumento da atividade monoaminérgica no encéfalo (SCHILDKRAUT, 1965; ELHWUEGI, 2004). Esta hipótese é sustentada principalmente pelo fato de que a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica aumentam

agudamente os níveis de monoaminas no encéfalo (NEMEROFF, 2007). Estudos neurobiológicos e neuroanatômicos também estão de acordo com a hipótese monoaminérgica e indicam que importantes alterações nos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico estão relacionadas com o sucesso do tratamento antidepressivo (CUMMINGS, 1993; ELHWUEGI, 2004).

Em se tratando de fármacos que atuam sobre o sistema nervoso central (SNC), os antidepressivos detêm uma fatia de 24% do volume de vendas, representando uma parcela significativa dos lucros das empresas farmacêuticas (SCHMIDT *et al.*, 2008). Existem várias classes de antidepressivos usados para o tratamento da depressão. Estes fármacos podem agir inibindo a enzima monoamina oxidase (iMAOs), como é o caso da fenelzina, selegilina e tranilcipromina; ou atuando sobre os sistemas de recaptação de monoaminas em conjunto, como é o caso dos antidepressivos tricíclicos, representados pela amitriptilina, desipramina, imipramina e nortriptilina. Podem ainda atuar como inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina, paroxetina, citalopram e sertralina; ou da recaptação de noradrenalina (ISRN), como a reboxetina. Em comum, estas classes agem aumentando a concentração de neurotransmissores na fenda sináptica (NEMEROFF e OWENS, 2002; NEMEROFF, 2007).

Entretanto, a ocorrência de um efeito tardio, que pode demorar de 3 a 5 semanas após o início do tratamento com esses fármacos, sugere que o aumento nos níveis de monoaminas não é o fator responsável *per se* pelo resultado observado na clínica, uma vez que o efeito farmacológico no metabolismo das monoaminas é essencialmente imediato (NESTLER *et al.*, 2002). Além disso, estes fármacos

proporcionam uma remissão completa dos sintomas para apenas cerca de 50% dos indivíduos, além de causarem efeitos colaterais, o que muitas vezes contribui para diminuir a adesão ao tratamento (BRUNELLO *et al.*, 2002). Esse cenário torna-se delicado quando se trata de pacientes com ideação suicida, justificando desta maneira, o desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas, ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica e a rapidez no tratamento da depressão.

Além do bem estabelecido papel do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão, atualmente se tem investigado o envolvimento de diversos outros fatores e sistemas de neurotransmissores na patogênese desta doença, tais como o sistema glutamatérgico (SKOLNICK, 2009), opióide (VILPOUX *et al.*, 2002; BERROCOSO *et al.*, 2004) e GABAérgico (BRAMBILLA *et al.*, 2003), além da via L-arginina-óxido nítrico (Da SILVA *et al.*, 2000; HARKIN *et al.*, 1999; 2003), metabolismo energético (MORETTI *et al.*, 2003) e estresse oxidativo (SARANDOL *et al.*, 2007). Daremos destaque para o sistema glutamatérgico devido ao grau de envolvimento com esta dissertação de mestrado.

De fato, o melhor entendimento das vias e mecanismos responsáveis pela ação dos antidepressivos pode contribuir substancialmente para uma melhor compreensão dos transtornos depressivos e para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o seu tratamento (WONG e LICÍNIO, 2001).

### 1.3. O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O glutamato é conhecido por ser o aminoácido excitatório mais abundante do SNC, onde sua transmissão é mantida sob fino controle e regulação, uma vez que é extremamente importante para mediar a resposta sináptica excitatória, podendo comprometer também o correto funcionamento das funções neurais (MATTSON, 2008; SEVERINO *et al.*, 2011). Após ser liberado na fenda sináptica, pode se ligar a uma série de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos compreendem os do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) e cainato (MELDRUM, 2000). Os receptores metabotrópicos por sua vez, compreendem 8 subtipos de receptores (mGlu1 a mGlu8), conforme sua homologia estrutural e função farmacológica (COUTINHO e KNOPFEL, 2002). Além disso, 5 transportadores de glutamato foram identificados no SNC de mamíferos, sendo dois deles predominantes nas células da glia e três em neurônios (SEAL e AMARA, 1999).

O aminoácido glutamato está presente na maioria das sinapses neurais sendo importante para a neurogênese, crescimento de neuritos, sinaptogênese e sobrevivência neuronal (MATTSON, 2008). Desta maneira, o sistema glutamatérgico desempenha importante papel em muitas funções fisiológicas neuronais, como aprendizado, memória, cognição, plasticidade neuronal, ações neurotróficas e neurotóxicas (MATTSON, 2008; VERKHRATSKY e KIRCHHOFF, 2007; POPOLI *et al.*, 2011). Na sinapse, após a ativação dos receptores e desencadeamento do influxo iônico, com modulação da produção de segundos mensageiros na célula pós-sináptica, o glutamato precisa ser

removido da fenda sináptica por sistemas de transporte, o que confere papel de destaque aos astrócitos nesta atividade de remoção (AMARA e FONTANA, 2002). Entretanto, quando o controle da excitação glutamatérgica é perdido, a hiperativação do sistema glutamatérgico leva a uma excitotoxicidade, devido ao aumento nos níveis de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ) intracelular, desencadeando uma série de eventos que culminam em morte celular (LIPTON e ROSEMBERG, 1994).

A excitotoxicidade glutamatérgica está implicada em uma grande variedade de condições neuropatológicas como a doença de Huntington, de Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, depressão, epilepsia e esquizofrenia (SANACORA *et al.*, 2008; DONG *et al.*, 2009). No hipocampo, está implicada nos transtornos de humor (ZARATE *et al.*, 2002) sendo que, níveis elevados de estresse e glicocorticóides (presentes em pacientes depressivos), estão relacionados a um aumento nos níveis de glutamato extracelular (LOWY *et al.*, 1995). Entre os diversos dados que relacionam anormalidades glutamatérgicas em pacientes diagnosticados com depressão, estão estudos que demonstram a atrofia de regiões do SNC diretamente envolvidas com o transtorno e níveis elevados de glutamato nas mesmas (SANACORA *et al.*, 2004), assim como uma diminuição na densidade neuronal e glial (DREVETS *et al.*, 1992; SHELINE *et al.*, 1996). Além disso, foram encontrados níveis séricos de glutamato elevados em pacientes depressivos (MAURI *et al.*, 1998) e uma associação entre estes níveis e a severidade dos sintomas (MITANI *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que este aumento é revertido com o tratamento antidepressivo, sugerindo um possível papel do sistema glutamatérgico na ação dos antidepressivos convencionais (MAES *et al.*, 1998).

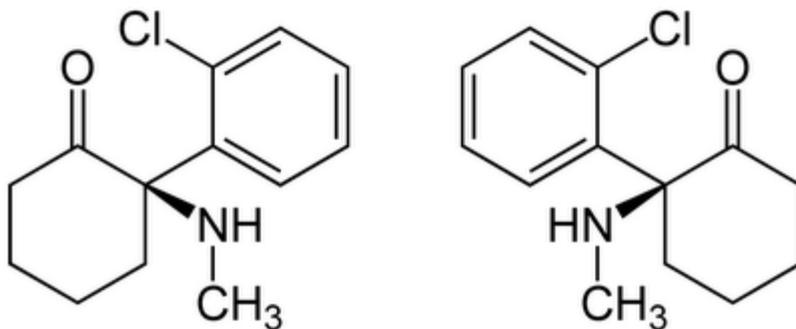
Em virtude de que os antagonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA podem modular o sistema monoaminérgico, bem como a noradrenalina e a serotonina podem atuar inibindo esses receptores, surgiu uma hipótese de que o efeito funcional da terapia antidepressiva convencional seria sua modulação secundária sobre os receptores NMDA (LOSCHER *et al.*, 1991; KIEFER *et al.*, 1999). Desta forma, possivelmente alterações sobre a plasticidade sináptica devem preceder os efeitos terapêuticos dos antidepressivos que agem sobre as monoaminas e estas adaptações ocorrem durante o período em que o fármaco ainda não demonstrou efeito sobre o comportamento do indivíduo. Sendo assim, os antagonistas de receptores NMDA poderiam resultar em uma eficácia mais rápida e direta, pois modulariam diretamente a plasticidade sináptica (SKOLNICK, 2009).

Dados da literatura, estudos clínicos e pré-clínicos dos últimos 10 anos, sugerem que compostos que inibem a função dos receptores NMDA (cetamina, memantina, MK-801, AP-7, CGP-37849, eliprodil, Ro25-6981,  $Zn^{2+}$ ) exibem propriedades antidepressivas (SKOLNICK, 1999; BERMAN *et al.*, 2000; ZARATE *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2008; SANACORA *et al.*, 2008). É notável destacar que, o antagonista de receptores NMDA cetamina produz, em seus estudos clínicos e em modelos animais, um rápido e sustentado efeito antidepressivo (BERMAN *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2011). Em virtude dos resultados surpreendentes obtidos com esse composto, os antagonistas de receptores NMDA estão sendo chamados de antidepressivos do novo milênio (SKOLNICK, 1999; LI *et al.*, 2011).

#### 1.4. CETAMINA E A VIA mTOR

A cetamina, 2-( $\sigma$ -clorofenil)-2-(metilamino)-ciclohexanona, é uma arilciclo-alkilamina derivada da fenciclidina (PCP) com peso molecular de 238 daltons, sendo sintetizada pela indústria química para uso farmacêutico, a partir do brometo de ciclopentilo, o-clorobenzonitrilo e metilamina (**Figura 1**). Sob o foco químico, é comercialmente utilizada como uma mistura racêmica de dois isômeros opticamente ativos (enantiômeros), o S(+) e o R(-) associada aos conservantes cloreto de benzetônio e ao clorbutanol (KOHRS e DURIEUX, 1998; LUFT e MENDES, 2005). Estudos em animais demonstraram que a S(+) cetamina tem aproximadamente quatro vezes mais afinidade para a área de ligação da fenciclidina no receptor NMDA comparado à R(-) cetamina (PLENNINGER *et al.*, 2002).

Historicamente, a cetamina foi sintetizada por Calvin Stevens, em 1962, no Laboratório Park & Davis (atual Pfizer), sendo denominada inicialmente de "CI-581". Usada principalmente como anestésico, produz um tipo de anestesia específico, denominada anestesia dissociativa, que se caracteriza por um estado cataléptico (GARCIA, 2008). Atualmente, seu uso é permitido apenas quando ministrado por médicos e veterinários, sendo corriqueiramente utilizada na indução e manutenção da anestesia em procedimentos cirúrgicos variados, em doses maiores que 2 mg/kg para humanos (GREEN *et al.*, 2000). Convém ressaltar que o uso deste psicomimético não tem sido restrito exclusivamente à prática clínica e pesquisa, mas também como droga de abuso (GLABE, 2004).



**Figura 1:** Imagem estrutural dos enantiômeros S(+) e R(-) da cetamina (esquerda e direita, respectivamente).

Farmacocineticamente, a cetamina é metabolizada através de reações de oxidação pelas enzimas microsossomais hepáticas em três metabólitos ativos: norcetamina, 5-OH-cetamina e 4-OH-cetamina, sendo a norcetamina o principal metabólito ativo, apresentando de 30% a 20% da potência do fármaco original. Todos os metabólitos são hidroxilados a hidroxinorcetina e em seguida conjugados a derivados glicuronídeos hidrossolúveis e excretados na urina (HEMELRIJCK e WHITE, 1997; PLENNINGER *et al.*, 2002; GARCIA, 2008). A cetamina apresenta alta lipossolubilidade e fraca ligação às proteínas plasmáticas (10 a 30%), resultando em grande volume de distribuição, e ação muito rápida, ultrapassando facilmente a barreira hematoencefálica. Seu *clearance* de eliminação é relativamente alto (1000 a 1600 mL/min), o que confere uma meia-vida curta, em torno de 2 a 3 horas (Garcia, 2008).

A biodisponibilidade da cetamina pela via intramuscular é de 93% e atinge o pico plasmático máximo em cinco minutos. Entretanto, por via oral ocorre extenso metabolismo de primeira passagem e a biodisponibilidade torna-se limitada, a cerca de 20%, razão pela qual

esta via de administração é amplamente negligenciada na clínica. A cetamina é rapidamente absorvida para a circulação sistêmica após injeção peridural com biodisponibilidade de 77%. A administração por via intranasal e retal, apresenta biodisponibilidade de 50 e 25%, respectivamente (HEMELRIJCK e WHITE, 1997; PLENNINGER *et al.*, 2002; GARCIA, 2008).

Diversos estudos clínicos na última década mostraram o potencial antidepressivo da cetamina. Inicialmente Berman e colaboradores (2000), mostraram uma melhora nos sintomas de pacientes resistentes ao tratamento para depressão, 72 horas após receberem uma infusão de cetamina. Mais recentemente, outro estudo clínico mostrou que em menos de duas horas, uma única infusão endovenosa sub-anestésica de 0,5 mg/kg de cetamina conseguia reverter os sintomas depressivos de pacientes resistentes ao tratamento convencional, sendo que esse efeito perdurava por até duas semanas (ZARATE *et al.*, 2006). Estes resultados revolucionaram a maneira como o tratamento da depressão era visto, no qual os efeitos dos antidepressivos clássicos eram demorados e pouco robustos.

Embora a farmacodinâmica clássica da cetamina envolva o antagonismo não competitivo dos receptores NMDA, acredita-se que a resposta antidepressiva rápida possa envolver um mecanismo mais abrangente e relativamente complexo, que será explicado em detalhes a seguir, e exemplificado na **Figura 2**.

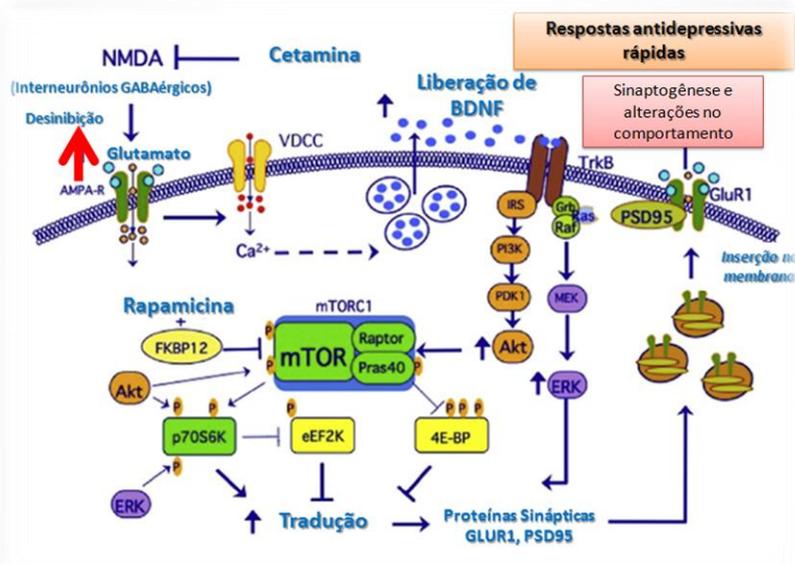
É postulado que o efeito rápido da cetamina se dê através do antagonismo dos receptores NMDA em interneurônios GABAérgicos, que estão tonicamente ativos. Em situações fisiológicas, estes interneurônios emitem projeções para os neurônios glutamatérgicos,

regulando negativamente a transmissão glutamatérgica por meio da liberação de GABA. A cetamina então, como já mencionado, inibe a atividade desses interneurônios GABAérgicos que por sua vez não vão mais inibir os neurônios glutamatérgicos, e que, como consequência, vão aumentar a exocitose de vesículas contendo neurotransmissores, como o glutamato na fenda sináptica. Desta forma, paradoxalmente o efeito inicial da cetamina é um aumento da atividade glutamatérgica, com aumento dos níveis de glutamato na fenda sináptica (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009; DUMAN e VOLETI, 2012; DUMAN *et al.*, 2012; LI *et al* 2010, 2011).

Na sequência, a cetamina exerce efeitos também nos neurônios pós sinápticos, também por meio do antagonismo não competitivo dos receptores NMDA. Este antagonismo impede a ação do glutamato (recém liberado na fenda, como mencionado) sobre estes receptores fazendo com que eles ativem preferencialmente os receptores AMPA.

A ativação dos receptores AMPA pelo glutamato é muito importante no efeito antidepressivo da cetamina, conferindo papel especial para esse receptor, que também é modulado diretamente por outros compostos, como as ampaquinas (MAENG *et al.*, 2008; SKOLNICK, 2008; KOIKE *et al.*, 2011). Com a ativação deste receptor, o neurônio pós sináptico sofre um influxo de íons sódio, acarretando em uma onda de despolarização transitória na membrana que acaba por ativar os canais de cálcio voltagem dependente (CCVD). O influxo de cálcio resultante deste processo permite a exocitose de vesículas contendo fatores neurotróficos, com destaque especial para o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). O aumento de BDNF por si só já é importante, uma vez que está relacionado com o aumento da

sobrevivência neuronal e reversão da atrofia observada no córtex e hipocampo de pacientes com depressão (MACHADO-VIEIRA *et al.*, 2009).



**Figura 2: Cetamina aumenta a atividade da mTOR e sinaptogênese.** A cetamina aumenta a atividade glutamatérgica nos receptores AMPA pós sinápticos, por meio do antagonismo dos receptores NMDA nos interneurônios GABAérgicos e nos neurônios pós sinápticos. A onda de despolarização resultante do influxo de sódio nestes receptores AMPA abre os canais de cálcio voltagem dependente permitindo a liberação de vesículas contendo BDNF. A ativação dos receptores trkB pelo BDNF ativa a via PI3K/AKT que fosforila subunidades do complexo mTOR, ativando-o e permitindo a regulação da síntese de proteínas sinápticas por meio da fosforilação de diversos substratos, como as cinases p70S6K, e 4E-BP. Tem-se um aumento da tradução de proteínas inerentes à sinaptogênese, como subunidades de receptores AMPA (GluR1) e proteínas de ancoragem (PSD95), bem como a inserção dos mesmos na fenda sináptica. Estes efeitos contribuem para alterações no

comportamento, e para o efeito antidepressivo rápido da cetamina, (para mais detalhes, ver texto) (Adaptado de DUMAN *et al.*, 2012).

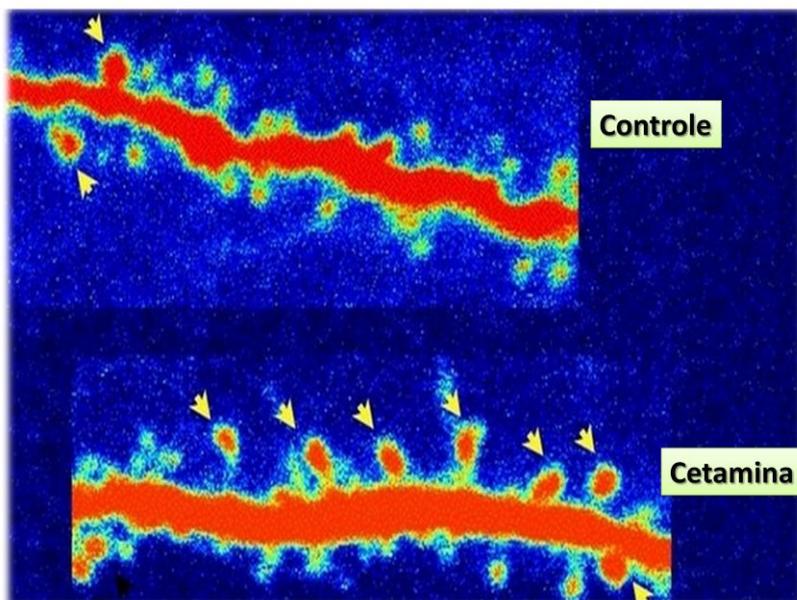
Estudos experimentais têm demonstrado resultados consistentes com a hipótese de que a menor expressão de BDNF esteja associada à depressão e que o seu aumento desempenhe um papel importante na ação de antidepressivos (DUMAN e MONTEGGIA, 2006). Em estudos *post-mortem* observou-se que indivíduos diagnosticados com o transtorno possuíam níveis reduzidos de BDNF no córtex pré frontal e no hipocampo, quando comparados com o grupo controle. Reforçando esta hipótese, em estudos *post-mortem* que analisaram pacientes tratados com antidepressivos, observou-se que a expressão de BDNF estava aumentada ou inalterada com relação ao controle (CHEN *et al.*, 2001; KAREGE *et al.*, 2005).

O aumento da liberação de BDNF pelos efeitos desencadeados pela cetamina permite a ativação de uma via de sinalização chave para o efeito antidepressivo rápido deste composto, a via PI3K/Akt/mTOR. Basicamente, o BDNF estimula os receptores trkB (tropomiosina cinase B) cuja fosforilação cruzada de seus domínios tirosina cinase (especificadamente dos sítio de tirosina 515) permite o acoplamento e fosforilação dos substratos de receptor de insulina (IRS), com consequente ativação por fosforilação da fosfatidilinositol 3'cinase (PI3K) e proteína cinase dependente de fosfatidilinosítídio 1 (PDK1). Com a fosforilação e ativação de PI3K fosforila-se a proteína cinase B (PKB) classicamente conhecida como AKT e que, finalmente levará a estimulação do complexo 1 das proteínas alvo de rapamicina em mamíferos (mTORC 1) (DUMAN *et al.*, 2012; DUMAN e VOLETI,

2012; DUMAN e LI, 2012). Além dessa via, a mTOR também pode ser fosforilada pela via das proteínas cinases ativadas por mitógenos e cinases reguladas por sinais extracelulares (MEK/ERK) e modulada negativamente pela glicogênio sintase cinase 3- $\beta$  (GSK3- $\beta$ ) (DUMAN e LI, 2012)

O complexo mTORC 1 é constituído por diversas proteínas como a mTOR, a proteína regulatória associada a mTOR (Raptor) e o substrato de AKT rico em prolina de 40 kDa (Pras 40), entre outras proteínas de menor interesse, que, quando devidamente acopladas, permitem a regulação da síntese proteica em diversos níveis. A mTOR é a principal proteína do complexo com domínios serina-treonina cinase que podem sofrer ativação ou inibição por meio de fosforilação por outras cinases. Um importante ativador do complexo é a AKT, por meio da fosforilação do resíduo serina-2448 na mTOR. Os efeitos desencadeados desta ativação envolvem a fosforilação da cinase S6 (S6K) (um membro da família de cinases ribossomais S6 de 70 kDa) e que fosforila a cinase de fator de alongamento eucariótico 2 (eEF2K) reprimindo-a e culminando em um aumento de tradução de proteínas. Além disso, a mTOR ativada também pode fosforilar a proteína ligante 4E (4E-BP) inativando-a e permitindo a liberação da proteína 4E para atuar no aumento da tradução de proteínas. Em conjunto essas inibições e ativações decorrentes do complexo mTORC 1 ativado favorecem a tradução de proteínas sinápticas, com destaque para subunidades de receptores glutamatérgicos AMPA (GluR1) e proteínas de ancoragem desses receptores, como as proteínas de densidade pós sináptica de 95 kDa (PSD95). Por fim este aumento de proteínas na fenda sináptica é relacionado ao aumento da sinaptogênese e, ao que se acredita com essa

hipótese, um efeito tipo-antidepressivo da cetamina (**Figura 3**) (DUMAN *et al.*, 2012).



**Figura 3 Cetamina aumentando a densidade sináptica.** Na figura pode-se observar um aumento na densidade sináptica no córtex pré-frontal de ratos, resultante do tratamento agudo com cetamina, comparado a animais controles. Cada espinha dendrítica é marcada com uma seta em amarelo. A imagem da microscopia foi tirada 24 horas após o tratamento com cetamina e colorida computacionalmente. Imagem gentilmente cedida pela Universidade de Yale, USA.

## 1.5. A CREATINA

Ao pesquisar constituintes químicos da carne, em 1832, o cientista francês Michel Eugene Chevreul descobriu um composto ao qual conferiu o nome de creatina (*kreas*, que vem da carne, em grego).

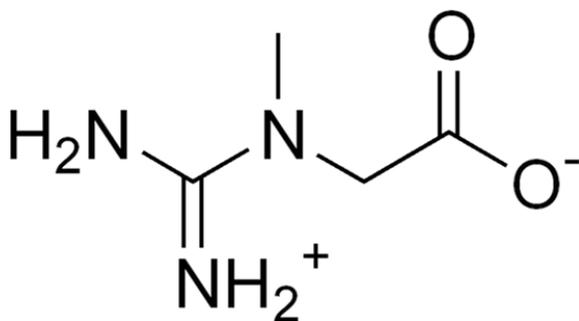
Em virtude dos problemas técnicos da época, apenas em 1847, o cientista sueco Justus Liebig observou o mesmo composto e conseguiu caracteriza-lo como um constituinte regular das carnes. Pesquisando mais a fundo, e curioso com o novo composto, Liebig decidiu investigar a sua concentração em raposas selvagens e em cativeiro, constatando que as raposas selvagens apresentavam níveis de creatina 10 vezes maiores que as raposas em cativeiro. Com isso Liebig concluiu que o trabalho muscular aumentado dos animais selvagens estava relacionado a um acúmulo de creatina, permitindo inferir que essa substância era importante para as funções musculares (DEMANT e RHODES, 1999).

Anos mais tarde, pesquisadores descobriram paralelamente a existência de moléculas com relativa semelhança estrutural ao examinar amostras de urina. Descobria-se então um importante subproduto da creatina, a creatinina (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Pesquisas adicionais mostraram que a creatina estava presente também no músculo de humanos, em quantidades expressivas, e inclusive com alterações moleculares peculiares que mais tarde foram descritas como sendo moléculas de fosfocreatina, ou creatina fosfato. Em 1930, Lundsgaard demonstrou que a contração muscular era acompanhada por uma quebra de fosfocreatina a creatina, propondo dessa maneira que a creatina, e compostos associados tinham um papel fundamental no suporte energético da contração muscular. Nesse momento, postulou-se que a molécula de fosfocreatina atuava como provedora de energia química para o processo de contração muscular, que diga-se de passagem, não era completamente entendido na época. É importante ressaltar que a molécula de trifosfato de adenosina (ATP) foi descoberta

posteriormente e neste momento era atribuída à mesma apenas um papel de regeneração dos níveis de fosfocreatina (BESSMAN *et al.*, 1980).

A creatina se tornou popular apenas em 1992, após as Olimpíadas de Barcelona, quando dois medalhistas de destaque da competição, Linford Christie e Sally Gunnell, declararam em nota oficial à imprensa que dedicavam a performance física espetacular apresentada nos jogos à suplementação à base de creatina. A partir disso, diversos estudos demonstraram que a suplementação com creatina era capaz de melhorar o desempenho físico de atletas em diversas modalidades esportivas (WILLIAMS *et al.*, 1999). Entretanto, somente no início deste século que alguns estudos começaram a apontar propriedades terapêuticas da suplementação com esse composto tipo-guanidina em algumas doenças neurológicas (ANDRES *et al.*, 2008).

A creatina é um composto de origem endógena e exógena (**Figura 4**), distribuído nos diversos tecidos corporais dos seres humanos e animais, com concentração em torno de 120-130g em indivíduos de 70kg, podendo variar, dependendo das características



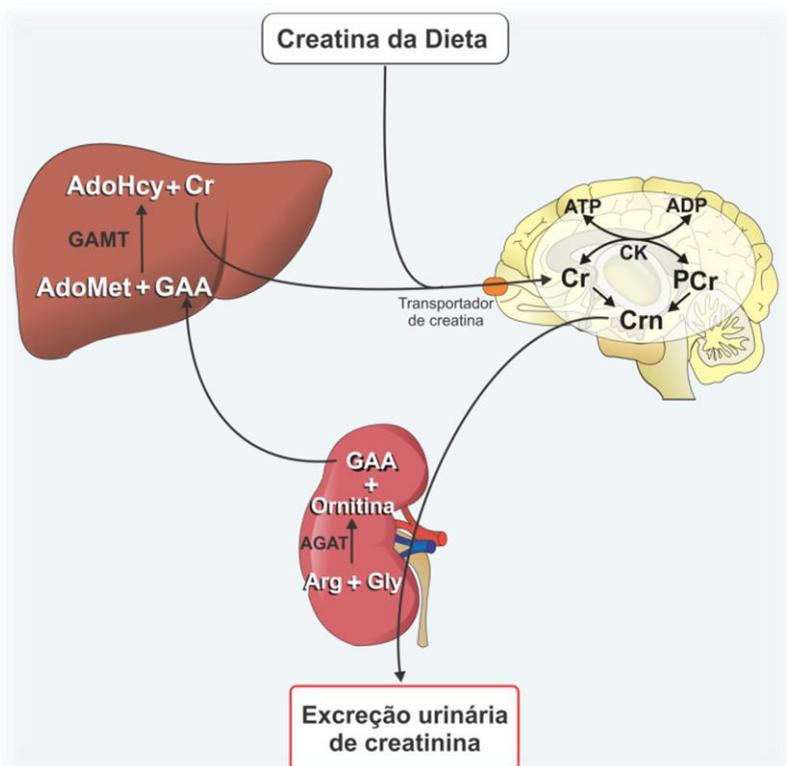
**Figura 4:** Fórmula estrutural da creatina.

físicas, alimentação ou suplementação. Estima-se que 95% da creatina corporal esteja localizada no tecido muscular e os 5% restantes no cérebro, fígado, rins e testículos (WALKER, 1979).

Endogenamente, o organismo sintetiza no fígado, rins e pâncreas cerca de 1 a 2 gramas de creatina por dia, sendo que o restante necessário para manter as concentrações normais vem da dieta, principalmente através da ingestão de peixes e carne vermelha (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Como observado na **Figura 5**, esta biossíntese endógena, ocorre inicialmente nos rins, a partir dos aminoácidos L-arginina e glicina formando guanidinoacetato (GAA) e L-ornitina em uma reação catalisada pela enzima L-arginina glicina amidinotransferase (AGAT). Na segunda etapa o GAA é transferido através da corrente sanguínea do rim até o fígado, onde sofre uma metilação pela enzima guanidinoacetato metil transferase (GAMT), sendo então sintetizada a molécula de creatina. Este composto tipo-guanidina recém formado entra na corrente sanguínea e pode ser captada por células alvos, como células musculares e neuronais, através de um transportador dependente de íons cloreto e sódio, também chamado de transportador de creatina ou SLC6A8, ou por transportadores de aminoácidos (WALKER, 1979; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

É interessante destacar que, estudos têm demonstrado que a creatina também pode ser sintetizada no cérebro de mamíferos, uma vez que a AGAT e a GAMT são expressas no SNC tanto no desenvolvimento quanto na fase adulta dos indivíduos (**Figura 6**) (BRAISSANT *et al.*, 2001; TACHIKAWA *et al.*, 2004; BRAISSANT *et*

*al.*, 2005; TACHIKAWA *et al.*, 2007). De maneira geral, os neurônios coexpressam AGAT e GAMT, apresentando um sistema de síntese de



**Figura 5: Esquema de síntese de creatina em mamíferos.** biossíntese endógena, ocorre inicialmente nos rins, a partir dos aminoácidos L-arginina e glicina formando guanidinoacetato (GAA) e L-ornitina em uma reação catalisada pela enzima L-arginina glicina amidinotransferase (AGAT). Na segunda etapa o GAA é transferido através da corrente sanguínea do rim até o fígado, onde sofre uma metilação pela enzima guanidinoacetato metil transferase (GAMT), sendo então sintetizada a molécula de creatina. Este composto tipo-guanidina recém formado entra na corrente sanguínea e pode ser captada por células alvas, como células musculares e

neuronal, através de um transportador de creatina. Ilustração gentilmente cedida por Priscila Batista.

creatina bastante eficiente, ao passo que os astrócitos não apresentam nenhuma dessas proteínas. Os oligodendrócitos expressam apenas AGAT, sintetizando GAA, que é transportado para outras células que expressem a GAMT, finalizando o processo de síntese de creatina. Existem também as chamadas células nervosas utilizadoras de creatina, que não apresentam uma maquinaria de síntese de creatina, porém são ricas nos transportadores SLC6A8. (BRAISSANT *et al.*, 2012; TACHIKAWA *et al.*, 2004; NAKASHIMA *et al.*, 2005). Em virtude da presença deste sistema de biossíntese no SNC, podemos inferir que o correto funcionamento e aporte energético atribuído à creatina é de suma importância para as corretas funções neurais.

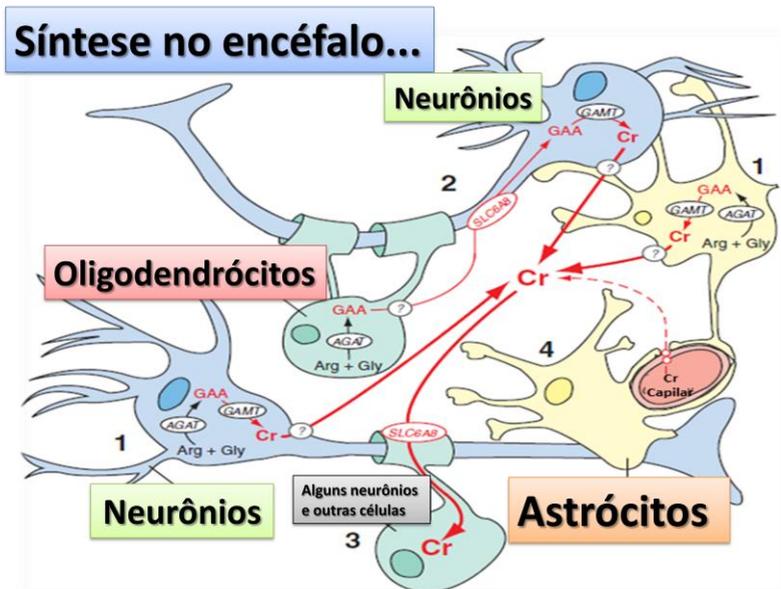


Figura 6: Esquema de síntese de creatina no encéfalo. Os neurônios coexpressam

AGAT e GAMT, apresentando um sistema de síntese de creatina bastante eficiente, ao passo que os astrócitos não apresentam nenhuma dessas proteínas. Os oligodendrócitos expressam apenas AGAT, sintetizando GAA, que é transportado para outras células que expressem a GAMT, finalizando o processo de síntese de creatina. Existem também as chamadas células nervosas utilizadoras de creatina, que não apresentam uma maquinaria de síntese de creatina, porém são ricas nos transportadores SLC6A8. Adaptado de BRAISSANT *et al.*, 2010.

Com respeito a creatina exógena, o seu mecanismo de absorção intestinal, aponta para a possibilidade de um sistema com transportador específico no intestino delgado (NASH *et al.*, 1994). É importante ressaltar ainda que, em virtude da sua semelhança estrutural com alguns aminoácidos, como a arginina e a lisina, a creatina também entra na circulação sistêmica por meio dos transportadores desses aminoácidos, principalmente na região proximal do intestino delgado. Embora a creatina não seja extensivamente metabolizada por primeira passagem, outras rotas de degradação são possíveis quando administrada por via oral. Em primeiro lugar, a taxa de formação e degradação é aumentada em meio ácido, no caso do pH estomacal (1,8), além da creatina ser convertida espontaneamente a creatinina (CANNAN E SHORE, 1928). Secundariamente, uma vez que a absorção intestinal de creatina se dá por mecanismos ativos, este sistema pode saturar, levando a uma absorção não linear em altas doses. Evidências mostram também que a excreção de creatina é aumentada em situações de ingestão excessiva (WIXOM *et al.*, 1979), bem como experimentos também demonstraram que a microflora intestinal tem habilidade de metabolizar a creatina em creatinina (TWORT *et al.*, 1912).

Uma vez na corrente sanguínea, a creatina é capturada de maneira saturável pelos tecidos corporais (leucócitos, hemácias, músculo esquelético e cardíaco, espermatozóides e retina) por difusão através das membranas. Isto é possível em razão das suas características químicas como hidrofiliidade e alta polaridade, além da presença de grupos funcionais guanidino e carboxil, detentores de cargas positivas e negativas, respectivamente (DASH *et al.*, 2001). No sistema nervoso central, células captam-na da periferia através de um transportador específico, o SLC6A8, expressos em células endoteliais dos microcapilares na barreira hematoencefálica, embora a maioria dos astrócitos (principal difusor de algumas substâncias da periferia em direção ao SNC) não apresentam o transportador de creatina. Além disso, células epiteliais do plexo coróide captam a creatina da barreira hematoencefálica e do líquido cefalorraquidiano. Em condições fisiológicas homeostáticas, o guanidinoacetato e a creatina passam através das células do epitélio ependimário até o líquido cefalorraquidiano e então regressam através das células epiteliais do plexo coróide, embora o guanidinoacetato regresse à periferia preferencialmente através do transportador de taurina (BRAISSANT, 2012). Farmacocineticamente, tanto a creatina endógena quanto a exógena são convertidas espontaneamente a creatinina, através de uma reação não enzimática, e esta por sua vez atravessa livremente a membrana celular, sendo posteriormente excretada pelos rins por filtração glomerular (GREENHAFF, 1996; WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000).

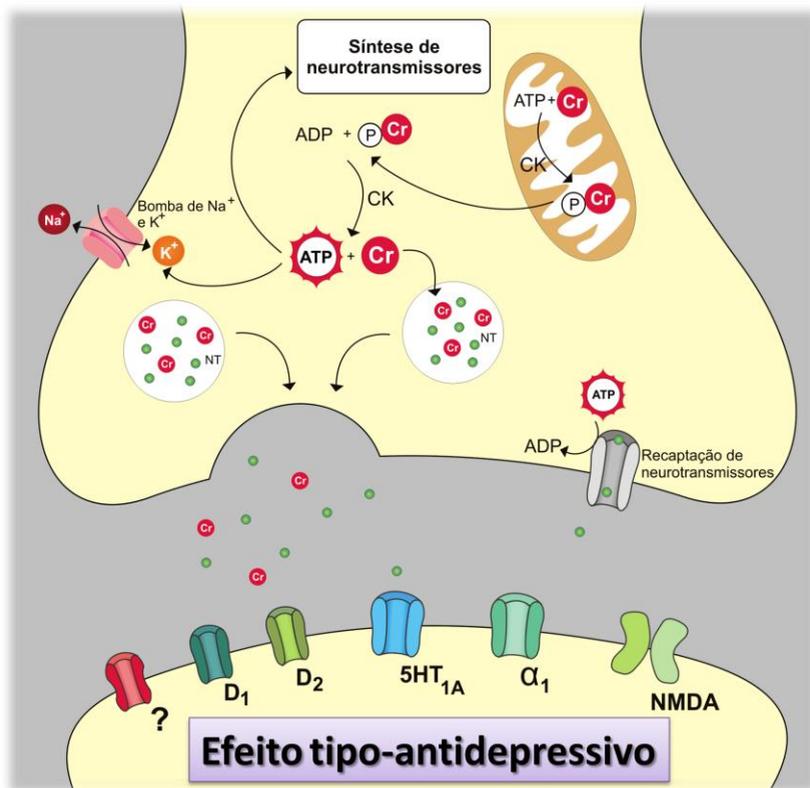
Energeticamente, o mecanismo de ação da creatina está intimamente relacionado com um sistema complexo e finamente regulado, o sistema creatina cinase/fosfocreatina. É relatado que existem

3 isoformas da creatina cinase (CK) no citosol celular, compostas por duas subunidades M (referentes a isoforma muscular) ou duas isoformas B (referentes a isoforma cerebral), e também uma combinação entre essas subunidades M e B. Com este quadro de combinações temos as seguintes isoformas: CK-MM, CK-BB e CK-MB, sendo que estas enzimas podem estar solúveis ou associadas a outras estruturas celulares, como o retículo sarcoplasmático no músculo (KRAUSE e JACOBUS, 1992). Nos vertebrados, existem isoformas da creatina cinase mitocondrial com características específicas inerentes aos tecidos corporais onde estão localizadas. A CK mitocondrial sarcomérica é encontrada no músculo estriado, enquanto a CK mitocondrial ubíqua é encontrada no cérebro, rins e esperma (BOERO *et al.*, 2003).

O propósito deste sistema no organismo é relacionado à manutenção de um tampão energético para que as funções do tecido aconteçam de maneira satisfatória. Sinteticamente, este sistema funciona da seguinte maneira: em tecidos alvo, a creatina pode ser fosforilada na mitocôndria pela enzima CK mitocondrial, sendo convertida então à fosfocreatina com o gasto de um ATP por molécula de fosfocreatina produzida. Com esta fosforilação a fosfocreatina consegue carrear o ATP gasto para o citoplasma por difusão, até 4 a 8 vezes mais rapidamente, aumentando muito a eficiência do transporte de equivalentes energéticos em regiões com demanda energética acentuada. No citosol, a fosfocreatina, por sua vez pode ser reconvertida a creatina por outra isoforma da CK, liberando uma molécula de ATP, sendo que a creatina formada é novamente transportada para o espaço intermembranoso mitocondrial (**Figura 7**) (LIPSKAYA *et al.*, 1982; KOTTKE,).

A creatina não está apenas envolvida no metabolismo energético, mas também parece apresentar um papel neuromodulador no SNC. Por meio da inibição de canais de potássio e ativação de canais de cálcio e sódio, acredita-se que a creatina seja excitada na fenda sináptica mediante um processo de despolarização. É sugerido que ela possa atuar como um co-transmissor, sendo excitada em conjunto com neurotransmissores (glutamatérgicos e GABAérgicos) e influenciando a atividade dos seus respectivos receptores pós-sinápticos, bem como regulando a homeostase de cálcio intracelular (ALMEIDA, *et al.*, 2006; GENIUS *et al.*, 2012). Apesar de todos os esforços de diversos laboratórios, até o momento, nenhum receptor específico para a creatina ou mesmo a fosfocreatina foi identificado purificado e clonado, (**Figura 7**).

Diversos estudos clínicos demonstram redução nos níveis de creatina em diversas regiões cerebrais de pacientes com depressão, principalmente no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo (NERY *et al.*, 2009; VENKATRAMAN *et al.*, 2009) e de fosfocreatina no encéfalo (KATO *et al.*, 1992; KATO *et al.*, 1994). Além destes compostos, existem bases na literatura que comprovam que a atividade da creatina cinase também encontra-se prejudicada no soro de pacientes com depressão (SORA *et al.*, 1986). Com respeito ao aspecto energético, estudos demonstraram que o modelo experimental de depressão induzido pelo estresse crônico imprevisível promove uma inibição nos complexos mitocondriais I, III e IV no córtex cerebral de ratos (REZIN *et al.*, 2008), uma área intimamente relacionada aos



**Figura 7: Sistema creatina/fosfocreatina e papel neuromodulador.** A manutenção do tampão energético da creatina inicia-se na mitocôndria, com a transferência de um grupamento fosfato do ATP para a creatina, pela creatina cinase mitocondrial (CK). A fosfocreatina formada segue então para o citosol onde é convertida à creatina e ATP, pela creatina cinase citosólica (CK). O ATP contribui para a manutenção dos níveis energéticos na célula nervosa, em atividades como recaptação de neurotransmissores (NT), transporte de vesículas, ativação de bombas dependentes de ATP, síntese de neurotransmissores, entre outras. Alguns estudos sugerem que a creatina possa ter um papel neuromodulador, sendo vesiculada e exocitada em vesículas glutamatérgicas e GABAérgicas, podendo atuar em diversos receptores como os dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, α<sub>1</sub>-adrenérgicos, NMDA, sendo determinante para o efeito tipo-antidepressivo deste

composto tipo-guanidina. Estuda-se a possibilidade de um receptor específico para a creatina embora não tenha sido clonado até o presente momento. Imagem gentilmente cedida por Priscila Batista.

transtornos de humor. É interessante ressaltar ainda que estudos demonstraram uma diminuição no metabolismo energético de lobos frontais e núcleos da base em indivíduos deprimidos (KENNEDY *et al.*, 2001; DREVETS *et al.*, 2002). Com base neste cenário é possível inferir o importante papel do sistema energético na fisiopatologia da depressão, e o benefício de moduladores desse sistema no transtorno, como a creatina.

O uso da creatina como antidepressivo, ou ao menos como adjuvante no tratamento deste transtorno felizmente já não é mais um mito. Diversos estudos clínicos já demonstraram a eficácia antidepressiva da suplementação com creatina como um potenciador dos efeitos de antidepressivos clássicos, como os ISRS, em pacientes refratários ao tratamento (KONDO *et al.*, 2011; LYOO *et al.*, 2012). Amital *et al.*, (2006ab) também descreve melhoras nos sintomas de pacientes que sofrem de estresse pós traumático, depressão e fibromialgia assim como Roitman *et al.*, (2007) demonstra resultados positivos no uso de creatina para o tratamento da depressão. É interessante destacar que, os resultados positivos da utilização de creatina são relativamente rápidos (cerca de 1 a 3 semanas) comparados às terapias convencionais, o que pode encorajar estudos relacionados ao efeito rápido desse composto (KONDO *et al.*, 2011; LYOO *et al.*, 2012; NEMETA e LEVINE, 2013).

## 1.6. MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

O grande diferencial dos transtornos psiquiátricos, com destaque para a depressão, quando comparado a algumas outras doenças é a ausência de marcadores em nível molecular, fidedignos, com boa reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade. A indisponibilidade de tais marcadores dificulta a reprodução total ou pelo menos em parte, dos sintomas da depressão em animais. Apesar disto, em termos pré-clínicos, os modelos animais são ferramentas indispensáveis na pesquisa que visa identificar novos compostos com potencial antidepressivo, bem como para fornecer novos conhecimentos inerentes à fisiopatologia do transtorno psiquiátrico (CRYAN *et al.*, 2002).

Modelos de validade preditiva como o teste do nado forçado (TNF) e o teste de suspensão pela cauda (TSC) são os modelos animais mais utilizados para estes ensaios pré-clínicos, seguidos de outros menos utilizados, como o teste de comportamento de auto-limpeza. No entanto, muitos sintomas característicos da depressão como o humor deprimido, sentimentos de culpa, ideação suicida entre outros, não podem ser avaliados em laboratório, com estes testes. Apesar disso, os mesmos são amplamente utilizados em experimentos com ratos (TNF apenas) e camundongos, face à boa reprodutibilidade observada e a facilidade de uso (CRYAN *et al.*, 2002).

O TNF (PORSOLT *et al.*, 1977) e o TSC (STERU *et al.*, 1985) são baseados na observação de que animais, colocados diante de situações inescapáveis desenvolvem uma postura de imobilidade após tentativas iniciais de fuga. Este tempo de imobilidade reflete a persistência do animal em escapar e também o desencorajamento do

animal em buscar formas efetivas de lidar com o estímulo estressante. É bem validado que o tratamento agudo e crônico com antidepressivos clássicos consegue diminuir este tempo de imobilidade (CRYAN *et al.*, 2002).

Além destes testes com validade preditiva confirmada, modelos animais de depressão com validade fenomenológica ou de constructo e face também são utilizados. Entre estes, destacam-se os modelos baseados na indução de estresse e os modelos farmacológicos para depressão (McARTHUR e BORSINI, 2006). Estes modelos farmacológicos, com destaque para o modelo da administração de corticosterona, serão melhor detalhados nesta dissertação de mestrado.

Os modelos farmacológicos induzem um comportamento tipo-depressivo através de alterações morfológicas e neuroquímicas semelhantes às encontradas na depressão (McARTHUR e BORSINI, 2006). Entre estes modelos destacam-se os da administração de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (CHOURBAJI *et al.*, 2006), interferon- $\alpha$  (MAENG *et al.*, 2000; MAKINO *et al.*, 1998, 2000), interleucina-1 (DUNN e SWIERGIEL, 2005), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (KASTER *et al.*, 2011), de anfetamina (CRYAN *et al.*, 2003) reserpina (McARTHUR e BORSINI, 2006) e de corticosterona (HELLSTEN *et al.*, 2002; AGO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008, 2009; DAVID *et al.*, 2009; RAINER *et al.*, 2011).

Situações estressantes, com relativa cronicidade, podem levar ao aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides (corticosterona em roedores e cortisol em humanos), e esse aumento resultar em uma desregulação do eixo HPA com consequente morte de neurônios hipocampais (NESTLER *et al.*, 2002). De fato, um grande número de

observações clínicas têm mostrado que a hipercortisolemia é presente em pacientes depressivos (AXELSON *et al.*, 1993). Baseado nesta teoria envolvendo a hiperativação do eixo, a injeção de doses repetidas de corticosterona vem sendo utilizada farmacologicamente como modelo pré-clínico de indução de comportamento tipo-depressivo. Satisfatoriamente e com boa reprodutibilidade, têm-se evidenciado que esta exposição crônica é capaz de induzir um aumento do tempo de imobilidade no TNF (GOURLEY *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009) e no TSC (ZHAO *et al.*, 2008). Além dos parâmetros comportamentais, o uso de corticosterona exógena também foi capaz de promover alterações neuroquímicas, inerentes a uma diminuição no metabolismo de monoaminas (INOUE e KOYAMA, 1996). Adicionalmente, observou-se um prejuízo na neurogênese adulta, bem como na morfologia dendrítica de neurônios piramidais hipocampais nas regiões de CA3 (MORALES-MEDINA *et al.*, 2009; WOOLLEY *et al.*, 1990), de CA1, (ALFAREZ *et al.*, 2009) e do giro denteado (KARISHMA e HERBERT, 2002). Nestas condições há um prejuízo dos mecanismos de neuroplasticidade, que pode então estar correlacionado ao comportamento tipo-depressivo, equivalente aos sintomas clínicos do estado depressivo.

Reciprocamente, vários estudos têm demonstrado que a administração crônica de compostos antidepressivos revertem este comportamento tipo-depressivo (CONRAD *et al.*, 2007; GOURLEY *et al.*, 2008; DAVID *et al.* 2009), restaurando a neurogênese no giro denteado, CA1 e CA3 e induzindo mudanças morfológicas nos dendritos apicais e nas células piramidais de neurônios adultos, aos níveis de controle (WATANABE *et al.*, 1992; CONRAD *et al.*, 2007;

QIU *et al.*, 2007). Desta forma, conclui-se que o aumento da neurogênese hipocampal e a normalização da morfologia neuronal, bem como sinaptogênese pode estar envolvida na reversão do comportamento tipo-depressivo induzido experimentalmente.

## 2. JUSTIFICATIVA

O tratamento para a depressão ainda está longe do ideal, uma vez que o tempo de latência para se obter os benefícios clínicos é relativamente longo (entre 3 a 5 semanas) e a terapia farmacológica disponível produz também uma grande quantidade de efeitos adversos. Sendo assim, há uma grande demanda por novos fármacos de ação rápida, segura e efetiva para a depressão. Dessa forma, novos estudos são necessários para a compreensão da modulação endógena do humor a fim de contribuir para o desenvolvimento de alternativas para o tratamento do transtorno depressivo.

Dentre as abordagens terapêuticas que prometem um efeito rápido destaca-se o uso de antagonistas de receptores NMDA, em especial a cetamina, atuando principalmente por meio da via de sinalização modulada por PI3K/Akt/mTOR (LI *et al.*, 2010). Ainda, alguns estudos reportam que a suplementação com creatina produz efeitos tipo-antidepressivo (ROITMAN *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2012), uma modulação sobre os receptores NMDA (BREWER e WALLIMAN, 2000; JURAVLEVA *et al.*, 2005; GENIUS *et al.* 2012) e fosforilação de substratos da mTOR na musculatura esquelética e em células C2C12 (DELDICQUE *et al.*, 2005, 2007). Com base nesse cenário, procuramos investigar se o efeito antidepressivo da creatina em um modelo de depressão induzido por corticosterona pode compartilhar mecanismos de ação similares com a cetamina, por meio de uma ativação da via de sinalização intracelular mediada por PI3K/Akt/mTOR e assim também apresentar uma ação antidepressiva rápida.

Considerando o impacto social da depressão, esperamos contribuir para o estabelecimento de possíveis alternativas terapêuticas ou que possam auxiliar no tratamento convencional para a depressão, bem como expandir os conhecimentos acerca da fisiopatologia da depressão e do efeito tipo-antidepressivo da creatina e da cetamina.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

O presente estudo objetiva investigar e comparar o potencial antidepressivo da creatina e da cetamina administradas agudamente, em um modelo de depressão induzido por corticosterona e possíveis mecanismos implicados neste efeito.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Em um modelo de depressão induzido por corticosterona:
  - Verificar o melhor período de tratamento crônico para indução do comportamento tipo depressivo em camundongos no modelo proposto, em testes como o TSC, o TCA e o teste de borrifagem de sacarose.
  - Verificar o efeito da administração aguda de creatina, cetamina ou fluoxetina no TSC ou TCA.
  - Investigar os níveis séricos de corticosterona em camundongos tratados com creatina e cetamina.
  - Determinar se o efeito tipo-antidepressivo do tratamento com creatina e cetamina é dependente da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.
  - Verificar e comparar o imunocontéudo de mTOR e seus níveis de fosforilação em hipocampus de animais tratados agudamente com cetamina e creatina.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. ANIMAIS**

Considerando a maior incidência de depressão em mulheres, foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, pesando entre 30-45 g, com idade entre 50 e 55 dias. Os animais foram mantidos a temperatura de 20-22 °C com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00-19:00 h). Esses camundongos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Todos os experimentos foram executados entre as 08h00min e 11h00min (N=8 animais por grupo). Os animais foram ambientados no local de realização dos experimentos 24h antes dos testes comportamentais e distribuídos de maneira aleatória nos grupos experimentais. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e o sofrimento dos animais. Os procedimentos experimentais foram aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA), sob protocolo n° PP00795.

### **4.2. AGENTES FARMACOLÓGICOS E TRATAMENTO**

Foram usados os seguintes agentes farmacológicos: creatina monohidratada, cetamina (um antagonista não competitivo de receptores NMDA), fluoxetina (um inibidor seletivo da recaptação de serotonina),

wortmanina (um inibidor irreversível de PI3K), rapamicina (um inibidor seletivo da mTOR) e corticosterona (um glicocorticoide.). Todos os agentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St Louis, Estados Unidos.

Esses compostos foram administrados pelas vias oral (p.o.) e intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 ml/kg, ou pela via intracerebroventricular (i.c.v.), em um volume de 3 µl/sítio. O veículo para os compostos administrados via oral foi água destilada, Tween 80 e dimetilsulfóxido (DMSO), e para os compostos administrados via intraperitoneal ou via intracerebroventricular foi salina (NaCl 0,9%) ou salina com DMSO (especificações a seguir).

A cetamina (i.p.) foi dissolvida em salina, enquanto que nas administrações por via oral de creatina e de fluoxetina, foi utilizada água destilada para dissolução. Nos tratamentos i.c.v. a wortmanina foi dissolvida em salina com DMSO 1% e a rapamicina com DMSO 100%. A corticosterona foi dissolvida em água destilada com 2% de Tween 80 e 0,2% de DMSO, colocada em sonificador por 2 horas e administrada oralmente. Os controles (veículo: água destilada ou salina) de cada grupo também receberam a mesma quantidade em porcentagem de DMSO e/ou Tween 80, para evitar qualquer possível efeito desses solventes.

Em especial, para o procedimento de administração dos compostos via i.c.v., os animais foram anestesiados por cerca de 15 segundos utilizando um recipiente com algodão embebido em éter. Este procedimento permitiu a contenção dos animais possibilitando a administração dos agentes farmacológicos, utilizando uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa

Hamilton de 25  $\mu$ l. A agulha foi inserida à mão-livre, perpendicularmente no crânio, diretamente no ventrículo lateral esquerdo, utilizando-se o bregma como referência. O local da injeção foi de 1 mm para a direita ou a esquerda do ponto médio de uma linha imaginária traçada até a base anterior das orelhas (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). A fim de se verificar o local exato da injeção, os animais foram dissecados e analisados macroscopicamente após os testes (KASTER *et al.*, 2007; BROCARDO *et al.*, 2008). Os resultados de camundongos que apresentaram qualquer sinal de hemorragia cerebral, ou procedimento de injeção mal sucedido, foram excluídos da análise estatística (total inferior a 5% dos animais utilizados).

Todas as concentrações dos agentes farmacológicos e protocolos (com algumas adaptações) são baseadas em estudos prévios do nosso grupo e com base na literatura (AGO *et al.* 2008; ZHAO *et al.* 2008, 2009; DAVID *et al.* 2009; BETTIO *et al.*, 2012; LUDKA *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2012).

#### 4.2.1. Investigação do comportamento tipo-depressivo induzido pela administração crônica de corticosterona

A corticosterona (20 mg/kg, p.o.) foi administrada aos animais, diariamente, entre 10h00min e 11h00min, durante 7, 14 e 21 dias para verificar o melhor tempo de administração crônica para executar os demais protocolos experimentais (**Figura 8**). Este modelo de depressão foi adaptado de acordo com os protocolos descritos por Ago *et al.* (2008), Zhao *et al.* (2008, 2009) e David *et al.* (2009). Após 24 horas da

última injeção de corticosterona os animais foram submetidos ao TSC ou ao teste do campo aberto (TCA) ou ao teste de borrifagem de sacarose (*splash test*), ou foram decapitados, para mensurações bioquímicas. Após o melhor tempo de tratamento crônico ter sido escolhido, em outro grupo de experimentos, investigou-se o efeito dos demais compostos (creatina, cetamina, fluoxetina e inibidores) administrados 24 horas depois da última administração de corticosterona.

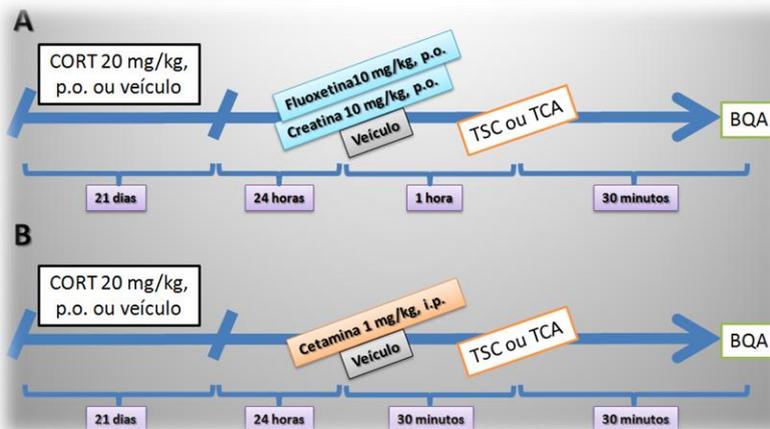


**Figura 8:** Esquema de tratamento para investigação do melhor período de tratamento crônico com corticosterona para indução do comportamento tipo-depressivo. (p.o.: via oral; TSC: teste de suspensão pela cauda; TCA: teste do campo aberto; *splash test*: teste de borrifagem de sacarose).

#### 4.2.2. Investigação do efeito agudo da cetamina, da creatina e da fluoxetina no modelo de depressão induzido por corticosterona

Em um grupo experimental controle, e com o objetivo de verificar o efeito tipo- antidepressivo agudo dos compostos, grupos de animais receberam separadamente, como pode ser observado na **Figura 9**, creatina (10 mg/kg, p.o.), fluoxetina (10 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) ou veículo (água destilada, para o grupo controle da creatina e da fluoxetina, e salina para o grupo controle da cetamina) 24 horas após a última administração crônica de 21 dias de corticosterona (20 mg/kg, p.o.) ou veículo (água destilada com 2% de Tween 80 e 0,2% de DMSO). Após 1 hora do tratamento com creatina ou fluoxetina (painel A), e 30 minutos após o tratamento com cetamina (painel B), os

animais foram submetidos aos testes comportamentais (TSC e TCA) ou sacrificados 90 minutos após o tratamento com creatina e 1 hora após o tratamento com cetamina, para realização dos testes bioquímicos (Western blot e dosagem de corticosterona).

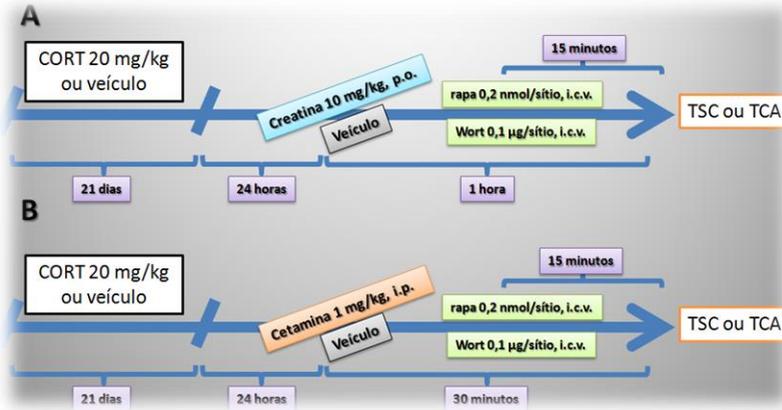


**Figura 9:** Esquema de tratamento para investigação do efeito agudo da creatina, fluoxetina (painel A) e cetamina (painel B) no modelo de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona. (i.p.: via intraperitoneal; p.o.: via oral; TSC: teste de suspensão pela cauda; TCA: teste do campo aberto; BQA: investigação de parâmetros bioquímicos).

#### 4.2.3. Investigação da participação da via PI3K/Akt/mTOR

Como mostrado na **Figura 10**, com o objetivo de investigar a participação da via PI3K/Akt/mTOR no tratamento agudo da creatina e cetamina, 24 horas após o último tratamento crônico com corticosterona ou veículo, grupos adicionais foram tratados com wortmanina (um inibidor irreversível de PI3K, 0,1 µg/sítio, i.c.v.) ou rapamicina (um inibidor seletivo de mTOR, 0,2 nmol/sítio, i.c.v.), ambas 45 minutos

depois da administração de creatina (painel A) ou 15 minutos depois da administração de cetamina (painel B). Decorridos 15 minutos das administrações de wortmanina e rapamicina, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (TSC e TCA).



**Figura 10:** Esquema de tratamento para investigação da via PI3K/Akt/mTOR no efeito agudo da creatina (painel A) e da cetamina (painel B) no modelo de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona, ou veículo. (CORT: corticosterona; i.p.: via intraperitoneal; p.o.: via oral; i.c.v.: via intracerebroventricular; rapa: rapamicina; wort: wortmanina; TSC: teste de suspensão pela cauda; TCA: teste do campo aberto).

### 4.3. TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA (TSC)

O tempo total de duração da imobilidade foi avaliado de acordo com o clássico método descrito por Steru *et al.* (1985). Neste teste, os camundongos fêmeas, acústica e visualmente isolados, foram suspensos 50 cm acima do chão e presos pela extremidade da cauda por fita adesiva e a imobilidade foi registrada durante 6 min (**Figura 11**). É bem validado que os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (STERU *et al.*, 1985), bem como, modelos de

depressão como o da corticosterona aumentam o tempo de imobilidade desses animais (CRYAN *et al.*, 2002).

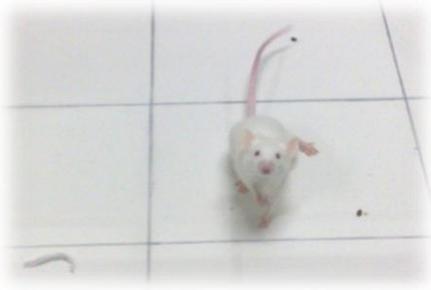


**Figura 11: Teste de Suspensão pela Cauda (TSC).**

#### **4.4. TESTE DO CAMPO ABERTO (TCA)**

Com o objetivo de excluir a possibilidade de que um eventual efeito tipo-antidepressivo ou depressogênico, ou seja, uma redução ou aumento respectivo da imobilidade no TSC fosse devido a um aumento ou diminuição na atividade locomotora, causada pela administração dos compostos testados, os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto, como descrito por RODRIGUES *et al.*, (1996). Nesse teste, 60 minutos após a administração da creatina e fluoxetina, e 30 minutos após a administração de cetamina, tanto nos grupos tratados cronicamente com veículo quanto com corticosterona, os animais foram colocados em uma caixa de madeira medindo 40X60X50 cm (largura/comprimento/altura), cujo chão é dividido em 12 quadrantes

iguais. O número de quadrantes cruzados pelo animal foi registrado durante 6 minutos (**Figura 12**). Após o teste o equipamento foi devidamente higienizado com lenço umedecido em álcool 10%.



**Figura 12:** Teste do Campo Aberto (TCA).

#### **4.5. TESTE DE BORRIFAGEM DE SACAROSE ("SPLASH TEST")**

O “*splash test*” foi utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza (“grooming”) dos animais, após a borrifagem dos mesmos com solução de sacarose a 10%. O tempo em que o animal permaneceu neste comportamento foi cronometrado durante 5 minutos (**Figura 13**) (DUCOTTET e BELZUNG, 2004). O “*splash test*” é um válido marcador comportamental, uma vez que animais submetidos a modelos comportamentais de depressão apresentam um menor tempo de auto-limpeza quando comparados aos animais controle (KALUEFF *et al.*, 2002, 2004; MORETTI *et al.*, 2012). Em modelos animais de depressão, a administração crônica de antidepressivos clássicos aumenta o tempo

despido neste comportamento (YALCIN *et al.*, 2005).



**Figura 13: Teste de Borrifagem de sacarose (*splash test*)**

#### **4.6. IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING**

O Western blotting foi executado conforme descrito previamente (LEAL *et al.*, 2002; CORDOVA *et al.*, 2004). O encéfalo de cada camundongo foi removido e os hipocampos foram rapidamente dissecados (4°C), colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas segundo OLIVEIRA *et al.* (2008). Os tecidos hipocampais foram homogeneizados mecanicamente em 400 µL de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e Coquitel inibidor de proteases). O material lisado foi centrifugado (10000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares, e o sobrenadante (300 µl) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS 8%) e aquecido a 100°C por 5 min. Após homogeneização uma alíquota

foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se numa proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25mM e azul de bromofenol, pH 6,8), finalizando o procedimento com adição de  $\beta$ -mercaptoetanol 8%.

Por meio do método descrito por Peterson (1977), foi estimado o teor proteico e a concentração proteica a partir de uma curva padrão de albumina de soro bovino. As proteínas (60  $\mu$ g de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 6% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitro-celulose. Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%.

Na sequência, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado diluído em 10 ml de TBS 5% (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As formas total e fosforilada da mTOR foram detectadas com o uso de anticorpos específicos da Cell Signaling® anti-mTOR e anti-fosfo-mTOR (Ser<sup>2481</sup>), diluídos em TBS-T contendo soroalbumina bovina (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween- 20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5) na diluição 1:1000. As membranas foram incubadas com o anticorpo de interesse overnight a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado com peroxidase (1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante e com o uso do equipamento de revelação Chemidoc® (Bio-Rad

Laboratories). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T.

A fim de se detectarem as formas fosforilada e total da mTOR na mesma membrana, os imunocomplexos foram removidos conforme descrito previamente por Posser *et al.*, (2007). De forma simplificada, as membranas foram lavadas uma vez com água duplamente deionizada (5 minutos), em seguida foram incubadas com NaOH 0,2 M (5 minutos), lavadas com água duplamente deionizada (5 minutos) e por último com TBS-T (5 minutos). As membranas desprovidas de imunocomplexos foram bloqueadas e submetidas ao mesmo protocolo descrito acima.

A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando Image Lab software® 4.1 (Bio-Rad Laboratories) O nível de fosforilação da mTOR (Ser<sup>2481</sup>) foi determinado pela razão DO da proteína fosforilada / DO da proteína total. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

Os anticorpos anti-p-mTOR e anti-mTOR detectam apenas uma banda de aproximadamente 289kDa.

#### **4.7. ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA**

Após a decapitação, para obtenção do soro, o sangue coletado foi centrifugado a 3000g por 10 minutos. Com a utilização do Kit comercial "Corticosterone EIA Kit ASSAY DESIGNS®", foi determinado a corticosterona nos grupos: controle, cetamina, creatina, corticosterona, creatina+corticosterona e cetamina+corticosterona. Apenas resultados com coeficiente de variação inferior a 2% nos testes intra e inter ensaio foram aceitos.

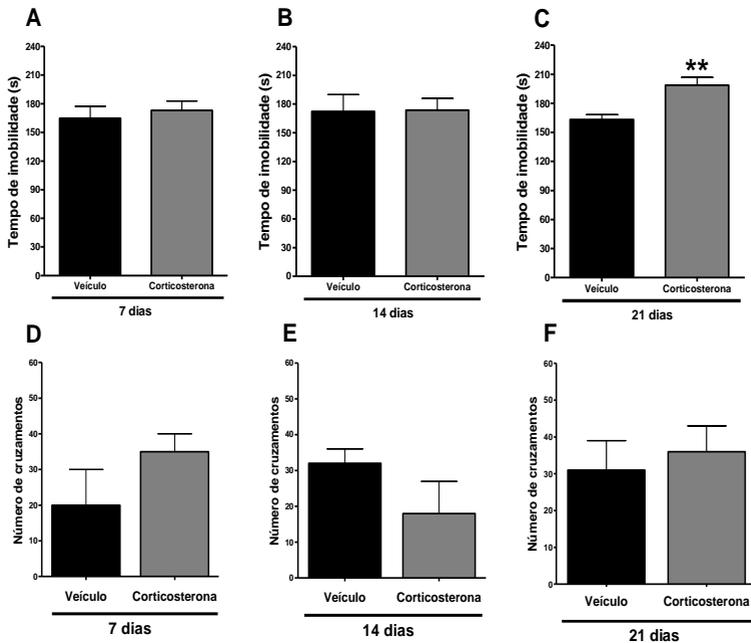
#### **4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Tanto para os parâmetros comportamentais quanto para os bioquímicos, os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, seguido pelo *post-hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado, e teste *t* de Student's. Foram considerados significativos os valores para  $P < 0,05$ . Para os cálculos estatísticos foi usado o programa Statistica 7.0. StatSoft. Inc.®

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Investigação do comportamento tipo-depressivo induzido pela administração crônica de corticosterona

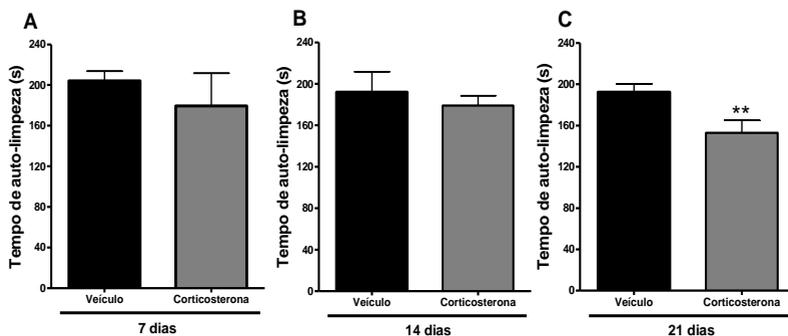
Na **Figura 14** podemos observar que a administração de corticosterona por via oral, com doses diárias de 20 mg/kg por 21 dias aumentou significativamente o tempo de imobilidade no TSC, (painel C,  $P < 0,01$ ). Períodos de tratamento inferiores a 21 dias, como mostrado nos painéis A (7 dias) e B (14 dias) não foram capazes aumentar o tempo de imobilidade no TSC, sendo então insuficientes para produzir um estado tipo-depressivo nesses animais. Afim de excluir a possibilidade de que o efeito no tempo de imobilidade produzido pelo tratamento com corticosterona fosse devido a um efeito sobre a atividade locomotora dos animais, foi realizado o teste do campo aberto. Conforme mostrado nos painéis D, E e F, a atividade locomotora dos animais, nos diferentes períodos de tratamento com corticosterona não foi alterada.



**Figura 14.** Curva de tempo-reposta do tratamento crônico por 7, 14 e 21 dias de corticosterona (20 mg/kg, p.o.) ou veículo no TSC (painéis A, B e C) e no TCA (painéis D, E e F). Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=6-8), \*\*P<0,01 quando comparados com os animais tratados com veículo. Os resultados foram avaliados por teste *t* de Student's.

Os resultados apresentados na **Figura 15** mostram que a administração de corticosterona apresenta resultados significativos ( $P<0,01$ ) na diminuição do tempo de auto-limpeza no teste de borrifagem de sacarose (*splash test*), apenas após 21 dias de tratamento crônico por via oral de doses diárias de 20 mg/kg (painel C). Períodos de tratamento inferiores a 21 dias, como mostrado nos painéis A (7 dias) e B (14 dias) não foram capazes de diminuir esse comportamento de

auto-limpeza, sendo então insuficientes para caracterizar um estado tipo-depressivo nesses animais.

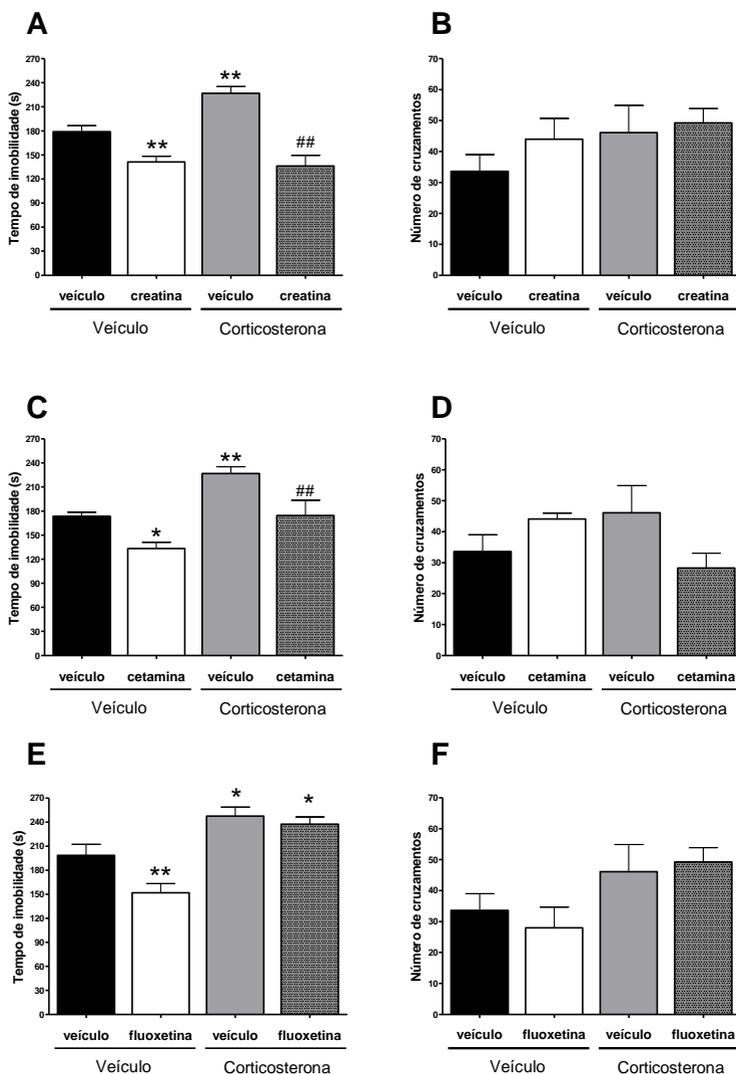


**Figura 15.** Curva de tempo-reposta do tratamento crônico por 7, 14 e 21 dias com corticosterona (20 mg/kg, p.o.) ou veículo no *splash test* (painéis A, B e C). Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=6-8), \*\*P<0,01 quando comparados com os animais tratados com veículo. Os resultados foram avaliados por teste *t* de Student's.

## 5.2. Efeito da administração aguda de creatina, cetamina e fluoxetina no modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por corticosterona no TSC e na atividade locomotora no TCA

Os resultados da **Figura 16** mostram que, no modelo de depressão induzido por 21 dias de injeções diárias de corticosterona (20 mg/kg, p.o.), o tratamento dos animais com uma única dose de creatina (10 mg/kg, p.o.) foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TSC (P<0,01), (painel A) sem causar alterações significativas nos parâmetros de locomoção (painel B). *Per se* a creatina também foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade comparada ao grupo controle tratado com veículo (P<0,01), (painel A) sem que esse efeito seja atribuído a um efeito estimulante (painel B). No painel C podemos observar que a

cetamina (1 mg/kg, i.p.) consegue reverter o efeito tipo-depressivo do tratamento com corticosterona ( $P < 0,01$ ), similarmente à creatina, sendo que esse efeito também não pode ser atribuído a um efeito psicoestimulante (painel D). A administração *per se* de cetamina também apresenta efeito tipo-antidepressivo comparado ao controle tratado com veículo ( $P < 0,05$ ), (painel C), sem alterações nos parâmetros de locomoção (painel D). No painel E é demonstrado que o tratamento agudo com fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) não é capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TSC nos grupos tratados cronicamente com corticosterona, embora *per se* a fluoxetina diminua o tempo de imobilidade ( $P < 0,01$ ) comparada ao grupo controle (painel E). Não são observadas alterações nos parâmetros de locomoção desses animais, como pode ser observado no painel F.

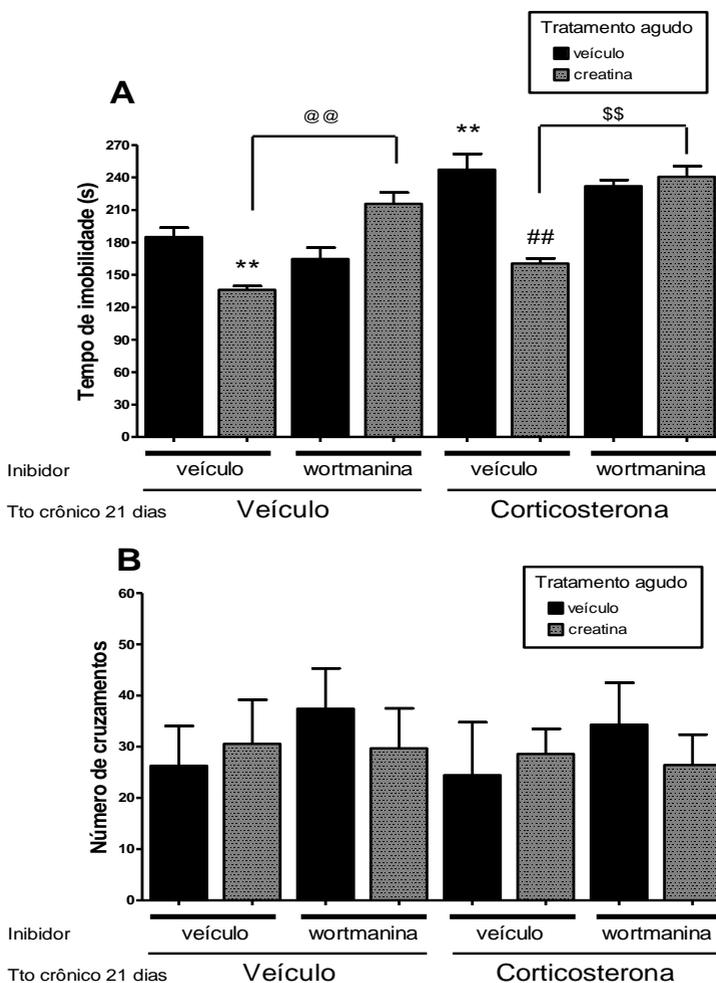


**Figura 16.** Efeito do tratamento agudo com creatina (10 mg/kg, p.o.), cetamina (1 mg/kg, i.p.) e fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) no TSC (painéis A, C e E) e no TCA (Painéis B e D e F) após 21 dias de tratamento crônico com corticosterona ou veículo. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=8), \*P<0,05 e \*\*P<0,01 quando comparado com o grupo controle (veículo+veículo), ## P< 0,01

quando comparado ao grupo tratado com veículo+corticosterona. Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

### **5.3. Envolvimento da via PI3K/AKT no efeito antidepressivo da creatina e da cetamina no modelo de depressão induzido por corticosterona**

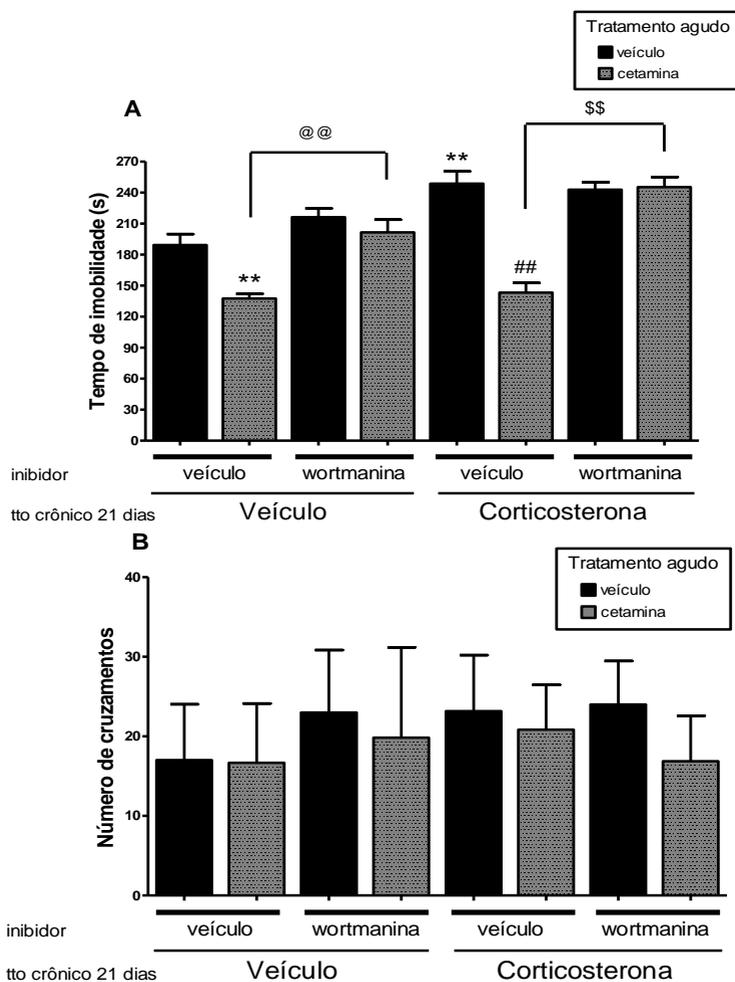
A **Figura 17** mostra que a via PI3K/AKT parece estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo rápido da creatina. Pode-se observar no painel A que os animais não submetidos ao tratamento com corticosterona e que receberam uma única injeção de creatina (10 mg/kg, p.o.) tiveram uma redução no tempo de imobilidade no TSC, comparado ao controle ( $P < 0,01$ ), e esse efeito foi revertido pelo tratamento com inibidor irreversível de PI3K wortmanina (0,1  $\mu\text{g/sítio}$ , i.c.v.,  $P < 0,01$ ). O painel A também mostra que os animais tratados 21 dias com corticosterona (20 mg/kg, p.o.) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TSC em relação ao controle ( $P < 0,01$ ), que foi prevenido pelo tratamento agudo com creatina ( $P < 0,01$ ). É interessante ressaltar que essa diminuição no tempo de imobilidade resultante do efeito da creatina foi abolido nos animais tratados com wortmanina ( $P < 0,01$ ). A análise estatística concluiu que não houve alterações significativas nos parâmetros de locomoção em nenhum dos grupos examinados, como pode ser observado no painel B.



**Figura 17.** Efeito do tratamento com wortmanina (0,1  $\mu\text{g}/\text{síto}$ , i.c.v.) na ação tipo-antidepressiva da creatina (10 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A), e sobre a locomoção no TCA (painel B) em animais tratados cronicamente com veículo ou corticosterona (20 mg/kg, p.o.) por 21 dias. Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=8), \*\*P<0,01 quando comparado com o grupo controle (veículo+veículo+veículo); @@ P<0,01 quando comparado com o grupo veículo+veículo+creatina; ## P<0,01 quando comparado com o grupo corticosterona+veículo+veículo e \$\$ P<0,01 quando comparado com o grupo

corticosterona+veículo+creatina. Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

Assim como a creatina, pode-se observar na **Figura 18**, que a via PI3K/AKT pode estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo rápido da cetamina tanto *per se* quanto no modelo de depressão induzido por corticosterona. Pode-se observar no painel A que os animais não submetidos ao tratamento com corticosterona e que receberam uma injeção aguda de cetamina (1 mg/kg, i.p.) tiveram uma redução no tempo de imobilidade no TSC, comparado ao controle ( $P<0,01$ ), e esse efeito foi revertido pelo tratamento com inibidor irreversível de PI3K wortmanina (0,1  $\mu\text{g/sítio}$ , i.c.v.,  $P<0,01$ ). O painel A também mostra que os animais tratados 21 dias com corticosterona (20 mg/kg, p.o.) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TSC ( $P<0,01$ ), que foi prevenido pelo tratamento de uma dose única de cetamina (1 mg/kg, i.p.,  $P<0,01$ ). Digno de nota, essa diminuição no tempo de imobilidade resultante do efeito da cetamina foi extinguida nos animais tratados com wortmanina ( $P<0,01$ ), exibindo o mesmo padrão dos animais tratados com creatina. A análise estatística concluiu que não houve alterações significativas nos parâmetros de locomoção em nenhum dos grupos examinados, como pode ser observado no painel B.

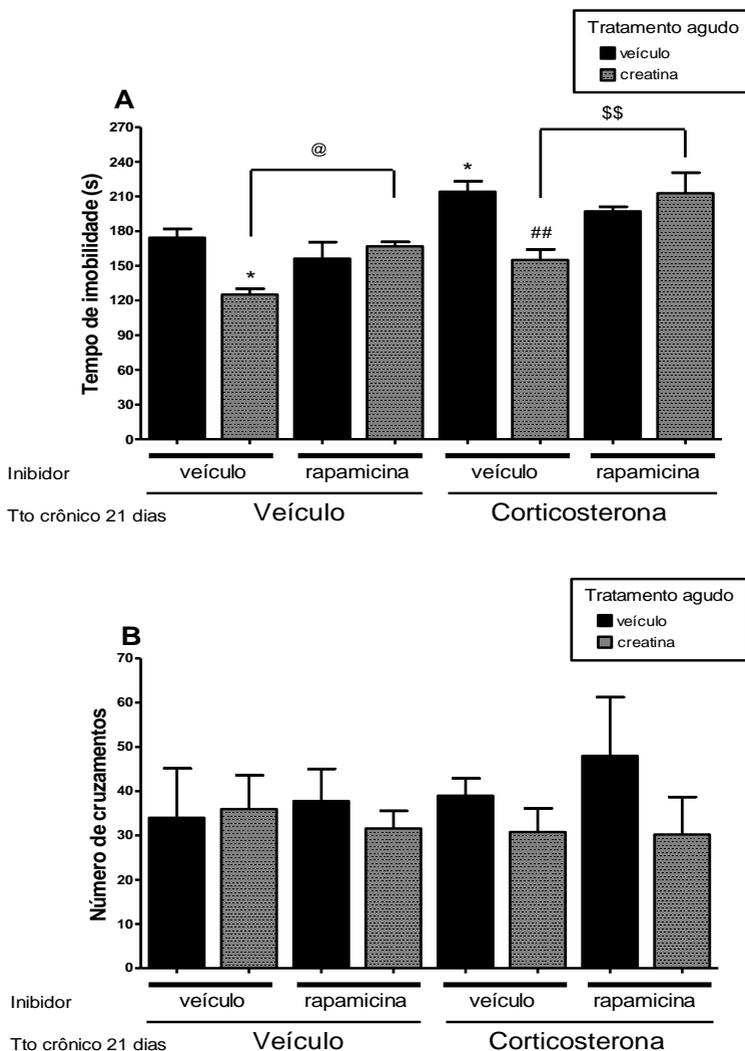


**Figura 18.** Efeito do tratamento com wortmanina (0,1 µg/sítio, i.c.v.) na ação tipo-antidepressiva da cetamina (1 mg/kg, i.p.) no TSC (painel A), e sobre a locomoção no TCA (painel B) em animais tratados cronicamente com veículo ou corticosterona (20 mg/kg, p.o.) por 21 dias. Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=8), \*\*P<0,01 quando comparados com o grupo controle (veículo+veículo+veículo); @@ P<0,01 quando comparado com o grupo veículo+veículo+cetamina; ## P<0,01 quando comparado com o grupo corticosterona+veículo+veículo e \$\$ P<0,01 quando comparado com o grupo

corticosterona+veículo+cetamina. Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

#### **5.4. Envolvimento da via mTOR no efeito antidepressivo da creatina e da cetamina no modelo de depressão induzido por corticosterona**

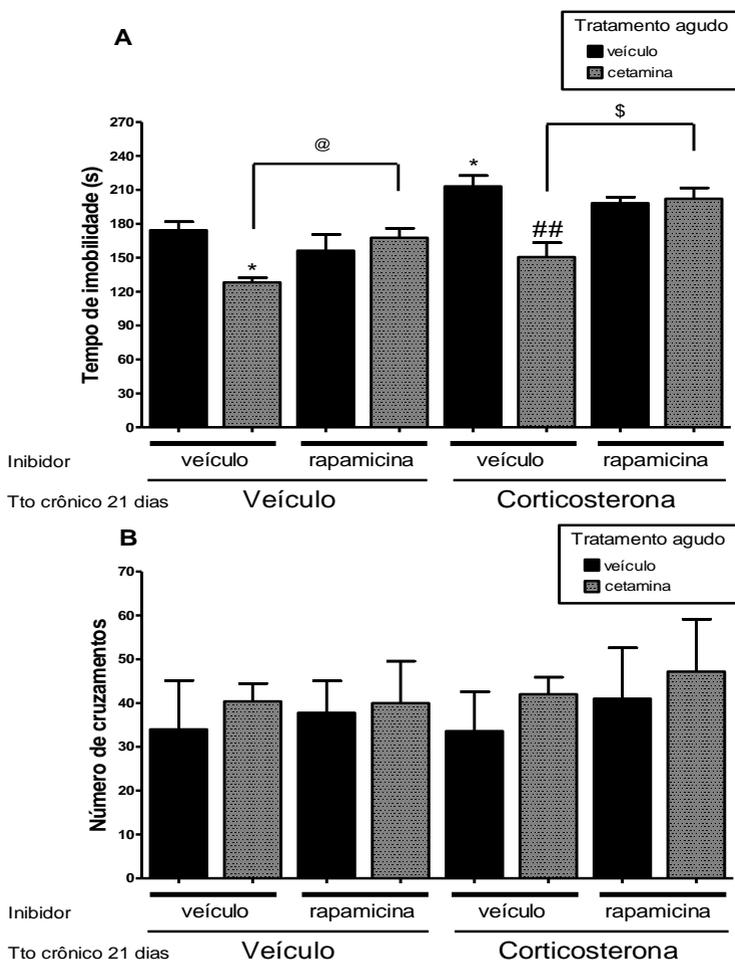
Os resultados expressos na **Figura 19** permitem inferir que a via mTOR pode estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo rápido da creatina. Pode-se observar no painel A que os animais não submetidos ao tratamento com corticosterona e que receberam uma injeção aguda creatina (10 mg/kg, p.o.) tiveram uma redução no tempo de imobilidade no TSC, comparado ao controle ( $P < 0,05$ ), e esse efeito foi revertido pelo tratamento com rapamicina (um inibidor seletivo de mTOR, 0,2 nmol/sítio, i.c.v.,  $P < 0,05$ ). O painel A também mostra que os animais tratados 21 dias com corticosterona (20 mg/kg, p.o.) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TSC ( $P < 0,01$ ), que foi prevenido pelo tratamento com uma única administração de creatina ( $P < 0,01$ ). É importante atentar para o fato de que essa diminuição no tempo de imobilidade resultante do efeito da creatina foi anulada nos animais tratados com rapamicina ( $P < 0,01$ ). A análise estatística não revela alterações significativas nos parâmetros de locomoção em nenhum dos grupos examinados, como pode ser observado no painel B.



**Figura 19.** Efeito do tratamento com rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.) na ação tipo-antidepressiva da creatina (10 mg/kg, i.p.) no TSC (painel A), e sobre locomoção no TCA (painel B) em animais tratados cronicamente com veículo ou corticosterona (20 mg/kg, p.o.) por 21 dias. Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=8), \*P<0,05 quando comparado com o grupo controle (veículo+veículo+veículo); @ P<0,05 quando comparado com o grupo

veículo+veículo+creatina; ##  $P<0,01$  quando comparado com o grupo corticosterona+veículo+veículo e \$\$  $P<0,01$  quando comparado com o grupo corticosterona+veículo+creatina. Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

Novamente compartilhando um padrão similar ao da creatina, a **Figura 20** demonstra que a via mTOR pode estar envolvida no efeito tipo-antidepressivo rápido da cetamina. Pode-se observar no painel A que os animais não submetidos ao tratamento com corticosterona e que receberam uma injeção aguda cetamina (1 mg/kg, i.p.) tiveram uma redução no tempo de imobilidade no TSC, comparado ao controle ( $P<0,05$ ), e esse efeito foi revertido pelo tratamento com rapamicina (um inibidor seletivo de mTOR, 0,2 nmol/sítio, i.c.v.,  $P<0,05$ ). O gráfico também mostra que os animais tratados 21 dias com corticosterona (20 mg/kg, p.o.) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no TSC ( $P<0,05$ ), que foi prevenido pelo tratamento de uma dose única de cetamina ( $P<0,01$ ). Essa diminuição no tempo de imobilidade resultante do efeito da creatina foi anulada nos animais tratados com rapamicina ( $P<0,05$ ). A análise estatística concluiu que não houveram alterações significativas nos parâmetros de locomoção em nenhum dos grupos examinados, como pode ser observado no painel B.

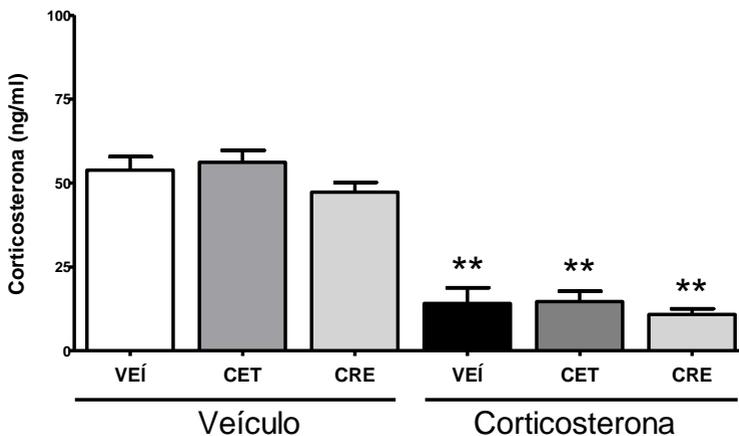


**Figura 20.** Efeito do tratamento com rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.) na ação tipo-antidepressiva da cetamina (1 mg/kg, i.p.) no TSC (painel A), e sobre locomoção no TCA (painel B) em animais tratados cronicamente com veículo ou corticosterona (20 mg/kg, p.o.) por 21 dias. Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=8), \*P<0,05 quando comparados com o grupo controle (veículo+veículo+veículo); @ P<0,05 quando comparado com o grupo veículo+veículo+cetamina; ## P<0,01 quando comparado com o grupo corticosterona+veículo+veículo e \$ P<0,05 quando comparado com o grupo

corticosterona+veículo+cetamina. Os resultados foram avaliados por ANOVA de três vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

### 5.5. Efeito da administração aguda de creatina e cetamina sobre os níveis de corticosterona no soro de animais submetidos ao tratamento crônico com corticosterona

A **Figura 21** demonstra que os animais tratados com corticosterona tiveram seus níveis séricos de corticosterona significativamente reduzidos, 24 horas após a última injeção crônica (21 dias) de corticosterona (20 mg/kg, p.o.), quando comparado aos controles que receberam veículo ( $P<0,01$ ). Além disso, foi demonstrado que nem a creatina (10 mg/kg, p.o.) e nem a cetamina (1 mg/kg, i.p.) foram capazes de alterar os níveis séricos de corticosterona tanto no grupo tratado cronicamente com veículo, quanto no grupo tratado com corticosterona.

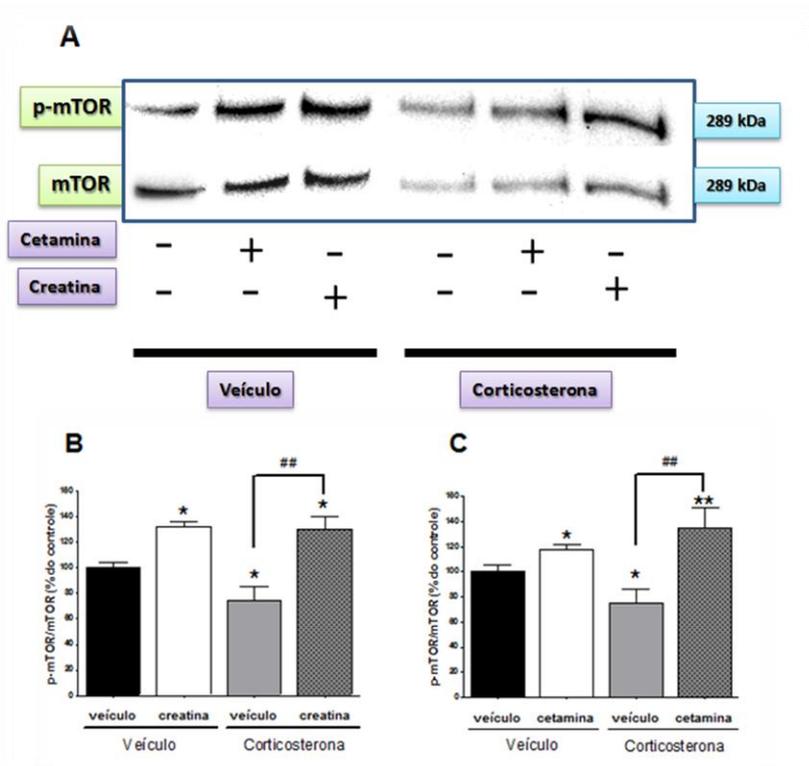


**Figura 21.** Efeito do tratamento com creatina (CRE, 10 mg/kg, p.o.) e cetamina (CET, 1 mg/kg, i.p.), sobre os níveis de corticosterona em animais submetidos

ao tratamento crônico por 21 dias com veículo ou corticosterona (20 mg/kg, p.o.). Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=8), \*\*P<0,01 quando comparados com o grupo controle (veículo+VEÍ). Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

### **5.6. Alterações no imunoconteúdo de mTOR no tratamento com creatina e cetamina no modelo de depressão induzida por corticosterona**

Utilizando a técnica de western blotting, os resultados apresentados na **Figura 22** mostram a fosforilação da proteína mTOR (Ser<sup>2481</sup>) no hipocampo de animais tratados com corticosterona (20 mg/kg, p.o.) cronicamente por 21 dias e tratados com uma única dose de creatina (10 mg/kg, p.o.) (painel B), ou cetamina (1 mg/kg, i.p.) (painel C). A análise por densitometria revelou um aumento no imunoconteúdo de p-mTOR nos animais tratados com creatina ou cetamina, tanto no grupo experimental controle (P<0,05 para ambas), quanto no grupo tratado cronicamente com corticosterona (P<0,05 para creatina e P<0,01 para cetamina). É importante ressaltar que esse aumento na fosforilação ocorreu no tempo de 90 minutos após a administração de creatina e 60 minutos após a administração de cetamina, tanto nos grupos submetidos ao tratamento crônico com corticosterona por 21 dias, quanto nos controles tratados com veículo. Além disso, foram detectadas diferenças significativas nos grupos tratados com corticosterona, que mostraram uma diminuição no imunoconteúdo da forma fosforilada da mTOR quando comparados com os controles que receberam apenas veículo (P<0,05). A imagem representativa pode ser observada no painel A.



**Figura 22.** Efeito do tratamento com creatina (10 mg/kg, p.o., painel B) e cetamina (1 mg/kg, i.p., painel C) sobre o imunocónteuído hipocámpal de p-mTOR no modelo de depressão induzido por 21 dias de tratamento com corticosterona. Os valores são expressos como média + E.P.M. (n=6), \*P<0,05 e \*\*P<0,01 quando comparados com o grupo controle (veículo + veículo); ##P<0,01 quando comparado com o grupo tratado com corticosterona + veículo. Os resultados foram avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve por objetivo investigar o efeito tipo-antidepressivo inerente à uma única administração de creatina, fluoxetina e de cetamina em um modelo de depressão induzido pelo tratamento crônico com corticosterona. Além disso, uma vez que a cetamina apresenta efeito antidepressivo rápido em alguns modelos de depressão em roedores e este efeito parece ser mediado pela ativação da via de sinalização intracelular mediada por PI3K/Akt/mTOR (LI *et al.*, 2010; 2011; YANG *et al.*, 2008), nós investigamos se a creatina poderia compartilhar com a cetamina um mecanismo de ação antidepressiva semelhante, envolvendo a ativação dessa via de sinalização intracelular.

O uso de modelos animais experimentais para auxiliar no melhor entendimento da fisiopatologia da depressão, possibilita também a descoberta de novos fármacos para serem utilizados posteriormente na clínica. Dentre esses modelos, os farmacológicos são muito importantes pois conseguem induzir um comportamento tipo-depressivo de maneira efetiva, e com boa reprodutibilidade. Por serem dotados de validade fenomenológica ou de constructo, esses modelos conseguem mimetizar também alterações neuroquímicas e morfológicas semelhantes às aquelas encontradas na depressão (McARTHUR e BORSINI, 2006). Tendo em vista que o estresse está intimamente relacionado à etiologia da depressão (NESTLER *et al.*, 2002; KESSLER *et al.*, 2005), e que um grande número de observações clínicas têm demonstrado que a hipercortisolemia, com consequente ativação do eixo HPA ocorre em mais de 50% dos pacientes deprimidos (AXELSON *et al.*, 1993; LIU e AGHAJANIAN, 2008; McEWEN *et al.*, 2012; MORRISON *et al.*,

2012) um modelo animal de depressão foi desenvolvido, o modelo da corticosterona (AGO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008, 2009; DAVID *et al.*, 2009; RAINER *et al.*, 2012). Esse modelo se baseia na administração crônica e sistêmica nos animais de altas doses de corticosterona, sendo que essa exposição promove alterações neuroquímicas e morfológicas, como a diminuição da neurogênese e volume hipocampal, evidenciada pela atrofia de neurônios piramidais hipocampais nas regiões de CA3 (MORALES-MEDINA *et al.*, 2009; WOOLLEY *et al.*, 1990), de CA1, (ALFAREZ *et al.*, 2009) e do giro denteado (KARISHMA e HERBERT, 2002), bem como alterações negativas no metabolismo de monoaminas (INOUE e KOYAMA, 1996) e redução drástica das taxas de síntese de ATP em mitocôndrias no encéfalo de ratos (KATYARE *et al.*, 2003). A exposição à glicocorticóides adrenais, como a corticosterona, também causa atrofia nos neurônios do córtex pré-frontal, de maneira similar a outros paradigmas comportamentais, como o estresse crônico imprevisível (ECI), além de promover um aumento no tempo de imobilidade nos testes preditivos de propriedade antidepressiva, como o TSC (HELLSTEN, J *et al.*, 2002; AGO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008, 2009). No presente trabalho, constatamos que a administração por via oral de corticosterona, por 21 dias foi capaz de induzir nos camundongos um aumento no tempo de imobilidade no TSC, sem alterações nos parâmetros locomotores no TCA. Além disso o comportamento de auto-cuidado também foi prejudicado após 21 dias de exposição, por meio da diminuição do tempo de comportamento de auto-limpeza no *splash test*. O período de cronicidade de 21 dias é necessário para induzir as alterações morfológicas e neuroquímicas que permitiram a observação desses efeitos comportamentais, uma vez que

os grupos experimentais expostos a períodos inferiores a 21 dias, como 7 e 14 dias de tratamento, não tiveram padrões comportamentais relacionados ao comportamento tipo-depressivo nesses testes. Corroborando com esses achados, dados da literatura mostram que camundongos tratados cronicamente com corticosterona exibem comportamento tipo-depressivo tanto no TNF (AGO *et al.*, 2008; GOURLEY *et al.* 2009; ZHAO *et al.*, 2009) quanto no TSC (AGO *et al.* 2008; ZHAO *et al.*, 2008), apenas após um período mínimo de 3 semanas de tratamento. Outros grupos também tem demonstrado a necessidade desses mesmos 21 dias de tratamento para a indução do aumento de imobilidade no TNF, em ratos (GREGUS *et al.*, 2005 e JOHNSON *et al.*, 2006). Adicionalmente, outros estudos demonstraram que antagonistas de receptores glicocorticóides previnem o comportamento tipo-depressivo em animais submetidos ao tratamento crônico com corticosterona (AGO *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2013), e em animais submetidos a outros modelos de depressão, como o estresse de separação materna (AISA *et al.*, de 2007) reforçando o fato de que níveis aumentados de corticosterona no cérebro de camundongos estão relacionados a um comportamento tipo-depressivo nesses animais.

Entretanto, observamos em nosso estudo que a exposição crônica a esse glicocorticóide é capaz de diminuir os níveis de corticosterona circulante no soro, possivelmente em virtude de sua ação farmacológica sobre receptores glicocorticóides e mineralocorticóides no hipotálamo, influenciando no controle por *feedback* negativo do eixo HPA. De fato, diversos relatos da literatura mostram que a administração crônica de glicocorticóides tem como consequência a supressão da produção endógena dos mesmos (HOWELL *et al.*, 2011;

CASTELA *et al.*, 2012). Com base nisso, e uma vez que em nosso trabalho os animais foram sacrificados cerca de 24 horas depois da última administração de corticosterona, podemos inferir que o eixo HPA é incapaz de manter os níveis normais de glicocorticóide no soro. É interessante ressaltar que, tanto a creatina quanto a cetamina não alteraram esses valores, provavelmente não estando envolvidas, ou não dependendo dessa questão neuroendócrina, para exercerem seus efeitos. É interessante ressaltar que a depressão atípica é característica por apresentar uma diminuição nos níveis de cortisol em humanos (O'KEANE *et al.*, 2012), sugerindo que o modelo de corticosterona utilizado, poderia se adequado para mimetizar algumas alterações fisiológicas que ocorrem neste transtorno de humor.

É bem validado que os modelos animais de depressão com validade de face ou constructo são responsivos apenas ao tratamento crônico com antidepressivos, mas não agudo (CRYAN *et al.*, 2002, 2005; NESTLER e HYMAN *et al.*, 2010). Vários estudos tem demonstrado que a administração exclusivamente crônica de compostos antidepressivos, como fluoxetina e imipramina, revertem o comportamento tipo-depressivo no modelo da corticosterona (GOURLEY *et al.*, 2008; GOURLEY e TAYLOR, 2009; DAVID *et al.* 2009), restaurando a neurogênese no giro denteado, CA1 e CA3 e induzindo mudanças morfológicas nos dendritos apicais e nas células piramidais de neurônios adultos, aos níveis do controle (WATANABE *et al.*, 1992; CONRAD *et al.*, 2007; QIU *et al.*, 2007). Com base nisso era esperado que a creatina e a fluoxetina administradas uma única vez não tivessem efeito no modelo induzido por corticosterona, embora o que observamos foi que a creatina administrada na dose de 10 mg/kg

conseguiu reverter esses parâmetros comportamentais de aumento de imobilidade no TSC, com apenas uma única administração, caracterizando um efeito robusto, efetivo e rápido no modelo, sendo que, não há registros na literatura até então, de um efeito agudo e rápido da creatina em um modelo de depressão com validade de face e constructo. Esse efeito rápido proposto para a creatina é compartilhado pela cetamina (1 mg/kg) agudamente, que também consegue reverter os efeitos comportamentais tipo-depressivo induzidos pela corticosterona no TSC, ao passo que a fluoxetina agudamente não foi capaz de reverter esse aumento de imobilidade, demonstrando que o modelo permanece refratário ao tratamento com um dos antidepressivos mais usados na clínica (NEMEROFF E OWENS, 2002; NEMEROFF, 2007). Dados da literatura corroboram com o efeito rápido da cetamina em baixas doses, em estudos utilizando ratos (Li *et al.*, 2010; 2011) e camundongos (LUDKA *et al.*, 2013). Em estudos clínicos a cetamina se mostrou eficaz na reversão dos sintomas depressivos em pacientes, bem como na melhora rápida em pacientes com ideação suicida (BERMAN *et al.*, 2000; ZARATE *et al.*, 2006; COVVEY *et al.*, 2012). Adicionalmente existem estudos clínicos que mostram que a creatina consegue reverter os sintomas depressivos em uma semana (KONDO *et al.*, 2011), duas semanas (LYOO *et al.*, 2012) e até três semanas (ROITMAN *et al.*, 2007; NEMETA e LEVINE, 2013), períodos relativamente rápidos quando comparado com as terapias clássicas que podem levar de 3 a 5 semanas para atingirem seus efeitos (TRIVEDI *et al.*, 2006).

Em termos pré-clínicos, estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a creatina administrada sistemicamente por via oral, nas mesmas doses desta dissertação de mestrado (10 mg/kg em fêmeas),

apresenta efeito tipo-antidepressivo em modelos preditivos como o TSC (CUNHA *et al.*, 2012). Tendo em vista que o sistema monoaminérgico está implicado na fisiopatologia da depressão (ELHWUEGI, 2004; ANDREWS *et al.*, 2011), e que a ativação da neurotransmissão monoaminérgica está envolvida no efeito antidepressivo de diversos compostos farmacológicos (YAMADA *et al.*, 2004) o nosso grupo sugere que a ativação do sistema monoaminérgico também está implicada no efeito antidepressivo da creatina, visto que experimentos demonstraram em camundongos, que o efeito anti-imobilidade da creatina no TSC depende de uma ativação de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, (CUNHA *et al.*, 2013b), serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> (CUNHA *et al.*, 2013a) e receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (CUNHA *et al.*, 2012).

Além do bem estabelecido envolvimento do sistema monoaminérgico, o sistema glutamatérgico também está implicado na fisiopatologia da depressão (NEMEROFF e OWENS, 2002; SANACORA *et al.*, 2009). A hipoativação dos receptores NMDA também pode causar alterações neuroquímicas e morfológicas responsáveis por uma série de eventos pontuais que acabam influenciando positivamente a neuroplasticidade (SKOLNICK *et al.*, 2009; DUMAN e VOLETI 2012). É importante salientar que a plasticidade sináptica é a habilidade de processar informações de outras aferências neuronais, estocar essa informação e gerar futuras respostas adaptativas (POON *et al.*, 2013). De fato, é demonstrado que o aumento na sinaptogênese é acompanhado prioritariamente por um aumento expressivo no número de espinhas dendríticas, sendo que diversos estudos suportam a ideia do envolvimento das espinhas dendríticas no

transtorno depressivo (HOLTMAAT e SVOBODA, 2009; YOSHIHARA *et al.*, 2009; DUMAN *et al.*, 2012).

É bem validado que a exposição ao estresse causa a atrofia de neurônios localizados em regiões intimamente implicadas com a depressão, como o córtex pré-frontal e o hipocampo (McEWEN, 2008; SHANSKY e MORRISON, 2009). Morfológicamente, essa atrofia inclui um decréscimo tanto no número quanto no tamanho das espinhas dendríticas, contribuindo para a redução no volume dessas estruturas cerebrais (DREVETS e FUREY, 2010; MACQUEEN *et al.*, 2008). Adicionalmente estudos demonstraram que a vulnerabilidade dos neurônios do hipocampo após exposição a glicocorticóides, como a corticosterona, é diretamente dependente da ativação do receptor NMDA, sendo que o tratamento com antagonistas desse receptor evitam a atrofia dendrítica induzida pela administração crônica de corticosterona ou induzida pelo estresse (ARMANINI *et al.*, 1990; MAGARIÑOS e McEWEN, 1995; RADLEY e MORRISON *et al.*, 2005).

De fato, as alterações comportamentais causadas pela exposição de ratos ao estresse crônico imprevisível mostraram que a administração de doses sub-anestésicas de cetamina, ou doses de Ro 25-6981 (ambos antagonistas de receptores NMDA) reverteram agudamente tanto o déficit das espinhas dendríticas quanto as alterações comportamentais, em um modelo classicamente responsivo apenas ao tratamento crônico com antidepressivos convencionais (LI *et al.*, 2011). Esse efeito rápido sobre a morfologia das espinhas sinápticas bem como sobre o comportamento dos animais é abolido em grupos experimentais tratados

com inibidores da via PI3K/AKT e da mTOR (LI *et al.*, 2010; DUMAN *et al.*, 2012)

Alterações na transdução de sinais intracelular que regulam a neuroplasticidade e sobrevivência celular, como a via de sinalização intracelular mediada por PI3K/AKT também estão implicadas nos mecanismos subjacentes à depressão, bem como nas respostas de antidepressivos (ROSA *et al.*, 2008; EISSA *et al.*, 2009). Vários estudos têm implicado a PI3K na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória e na depressão (KELLY LYNCH, 2000; DWIVEDI *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008). Apesar de um grande número de ativadores da PI3K terem sido identificados, muito estudos demonstram que os efeitos sobre a sobrevivência celular ocorrem através da proteína AKT, uma vez que produtos lipídicos de PI3K atuam como segundos mensageiros, recrutando e ativando proteínas intracelulares como a AKT (TOKER, 2000; SUTTON e CHANDLER, 2002; BRASIL *et al.*, 2004, HANADA *et al.*, 2004). De maneira geral, a ativação da via de sinalização intracelular mediada por PI3K/AKT é modulada por diversos receptores e está intimamente relacionada com o crescimento de neuritos, plasticidade sináptica, efeito tipo-antidepressivo induzido pela inativação de receptores NMDA e pela ativação de receptores de neurotrofinas, com destaque especial para o receptor de BDNF (para melhor entendimento ver **Figura 1**) (KELLY e LYNCH, 2000; DUMAN *et al.*, 2012). Ademais, estudos *post mortem* identificaram uma redução significativa na expressão e na atividade de PI3K e AKT em pacientes suicidas (KAREGE *et al.*, 2007; DWIVEDI *et al.*, 2008). É importante ressaltar que alguns estudos tem demonstrado que a AKT desempenha um importante papel na ação de estabilizantes de humor e

em processos de aprendizado e memória (SUI et al., 2008; ABELAIRA et al., 2011).

Com base no envolvimento dessa via na depressão, o presente trabalho investigou também o papel da PI3K utilizando um inibidor covalente, específico e irreversível da PI3K, a wortmanina (um metabólito do furanoesteróide dos fungos *Talaromyces* (*Penicillium wortmannii*) (HOU e KLANN, 2004). A reversão da redução no tempo de imobilidade causada pela administração aguda de creatina (10 mg/kg, p.o.) e cetamina (1 mg/kg, i.p.) no TSC tanto nos animais submetidos ao modelo de depressão quanto no grupo experimental controle pela wortmanina, sugere o envolvimento de PI3K no efeito tipo-antidepressivo destas moléculas.

Em virtude da relação direta entre PI3K/AKT e o complexo da proteína mTOR (DUMAN e VOLETI et al., 2012) foi investigado também, o envolvimento da mTOR no efeito tipo-antidepressivo da creatina e da cetamina, usando a rapamicina. Esse composto é um derivado de bactérias encontradas no solo da Ilha de Páscoa (Rapa Nui) que possui propriedade antiproliferativa através da inibição da atividade da mTOR (VÉZINA et al., 1975; BENJAMIN et al., 2011). A rapamicina exerce a sua atividade inibitória por meio da associação com a proteína FKBP12 sendo que esse complexo formado interage com o complexo mTORC1 diminuindo a sua atividade regulatória por meio de alterações conformacionais que impedem a interação com outros substratos responsáveis pela tradução de proteínas, diminuindo assim a plasticidade sináptica (ver **Figura 2**) (BENJAMIN et al., 2011; DUMAN et al., 2012). Nossos resultados mostraram que tanto o tratamento agudo com creatina (10 mg/kg, p.o.), quanto o tratamento

agudo com cetamina (1 mg/kg, i.p.) tiveram o seu efeito de diminuição do tempo de imobilidade no TSC abolido pelo pré-tratamento com rapamicina, no modelo de indução de comportamento tipo-depressivo induzido por corticosterona. Com isso, tanto a creatina como a cetamina, podem estar produzindo um comportamento tipo-antidepressivo observado no TSC, por meio da via PI3K/Akt/mTOR.

A estimulação da mTOR ocorre através da fosforilação de um domínio Serina (2481) específico por AKT. Essa ativação leva à fosforilação e ativação de P70S6 cinase e à repressão de 4E-BP tendo como efeito resultante, a regulação da tradução de proteínas sinápticas através de diversos substratos. Essa estimulação da síntese proteica pela mTOR, eleva os níveis de proteínas associadas ao funcionamento sináptico como a sinapsina-1, a PSD95 e o GluR1, levando ao aumento no número de espinhas dendríticas e ao comportamento antidepressivo (HOEFFER e KLANN, 2010; LI *et al.*, 2010; DUMAN *et al.*, 2012). Periféricamente, nossos dados estão de acordo com alguns estudos que demonstraram que LY294002 (inibidor não seletivo de PI3K) e rapamicina reprimem a atividade da creatina cinase muscular em células C2C12, sugerindo que a AKT e mTOR desempenham um papel importante na atividade da creatina cinase (SUMITANI *et al.*, 2002). Ademais, a rapamicina bloqueou a diferenciação de células C2C12 induzida pela creatina, sugerindo que a cinase mTOR/P70S6 poderia estar potencialmente envolvida no efeito induzido pela creatina na diferenciação de células musculares (DELDICQUE *et al.*, 2007). Os dados da relação entre creatina e mTOR no SNC são escassos, dessa maneira, acreditamos que os resultados deste estudo fornecem dados preliminares e inovadores da participação de PI3K/Akt/mTOR no efeito

tipo-antidepressivo da creatina, bem como uma relação direta entre tratamento e modulação no SNC.

Recentemente, relatou-se que a cetamina aumentava os níveis de proteínas sinápticas no hipocampo e córtex pré-frontal, resultando em um efeito tipo-antidepressivo em ratos machos não estressados, sendo que esse efeito era abolido com o uso do inibidor de mTOR rapamicina (LI *et al.*, 2010). Em estudos subsequentes foi demonstrado que a cetamina apresentava efeitos antidepressivos em animais submetidos a paradigmas de estresse como o estresse crônico imprevisível (ECI), e que esse efeito também seria bloqueado em animais tratados com rapamicina (LI *et al.*, 2011). Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que ratos machos submetidos ao ECI apresentavam uma diminuição nos níveis de sinapsina I, GluR1 e PSD95, e que foram rapidamente revertidos pela cetamina, sendo que essa reversão foi bloqueada pela coadministração com rapamicina. Dessa maneira esses dois importantes estudos estão em linha com os dados apresentados em camundongos nesta dissertação, demonstrando que a cetamina pode aumentar a sinaptogênese dependente da ativação de mTOR e que esse efeito é abolido em animais tratados com rapamicina ou inibidores de PI3K.

Uma vez que adaptações moleculares mediadas pela ativação de vias de sinalização intracelular podem estar envolvidas no efeito de agentes farmacológicos antidepressivos (FISAR e HROUDOVÁ, 2010) é necessário buscar e elucidar com precisão os mecanismos intracelulares e bioquímicos responsáveis pelos seus efeitos terapêuticos. Em virtude disso, nosso trabalho buscou avaliar se o modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por corticosterona

levou a alterações nos níveis de fosforilação da proteína mTOR (Ser<sup>2481</sup>), bem como o efeito da creatina e da cetamina nesse modelo.

Dados da literatura mostram que administrações sucessivas de corticosterona estão implicadas em uma redução nos níveis de fosforilação de mTOR bem como na atividade modulatória da via PI3K/AKT, com implicações diretas sobre o comportamento (HOWELL *et al.*, 2011). Segundo esse estudo, a ação da corticosterona sobre os receptores glicocorticóides no córtex pré-frontal e hipocampo estaria levando a uma diminuição nos níveis do receptor Flk1 para VEGF (fator de crescimento vascular endotelial). Esse receptor estaria diretamente atrelado a via PI3K/AKT regulando de maneira direta a fosforilação de mTOR. Nossos resultados estão de acordo com esse estudo de HOWELL *et al.* (2011), mostrando uma diminuição nos níveis de imunocontéudo da forma fosforilada de mTOR nos animais submetidos a um tratamento crônico de 21 dias com corticosterona. Pode-se considerar que essa ativação excessiva dos receptores glicocorticóides no córtex e hipocampo dos camundongos pode se relacionar a uma regulação negativa de outros receptores para fatores neurotróficos, incluindo o de BDNF além de FLK1 e dessa maneira inibir a ativação da via PI3K/mTOR e regular negativamente a expressão de proteínas sinápticas diretamente relacionadas com a plasticidade sináptica. É interessante ressaltar que nosso estudo demonstrou um aumento do imunocontéudo da forma fosforilada de mTOR tanto após uma única administração de creatina (10 mg/kg, p.o.) quanto após a administração de cetamina (1 mg/kg, i.p.), e que esse aumento na fosforilação da mTOR se deu de maneira rápida, em cerca de 90 minutos após a administração de creatina e 60 minutos após a administração de

cetamina. Uma vez que esses dados estão associados aos animais que tiveram uma diminuição no tempo de imobilidade após tratamento crônico com corticosterona, podemos inferir que a creatina e a cetamina compartilham um efeito tipo-antidepressivo que pode estar relacionado a um aumento da fosforilação de mTOR.

É bem validado na literatura que a cetamina apresenta efeito estimulador sobre a fosforilação de mTOR (LI *et al.*, 2010, 2011; DUMAN e VOLETI 2012; YANG *et al.*, 2008) e que essa fosforilação está envolvida com a regulação da síntese de proteínas em diversos níveis. LI *et al.*, (2010) demonstrou em ratos que a administração de baixas doses de cetamina aumenta a expressão de mTOR fosforilada, e de várias proteínas relacionadas à regulação da síntese de proteínas sinápticas, bem como ao aumento direto de novas sinapses no córtex pré-frontal e hipocampo desses animais. Entre as proteínas que tiveram sua expressão aumentada destacam-se a p-p70S6K, p-4E-BP1, sinapsinas, PSD95 e GluR1. Corroborando com nossos dados, a administração de rapamicina nesses animais aboliu completamente o efeito sobre a fosforilação dessas proteínas, bem como os efeitos comportamentais também observados.

Com respeito a relação entre creatina e mTOR, existem poucos relatos na literatura suportando a relação entre as mesmas. Deldicque *et al.*, (2005) demonstrou que a suplementação com creatina em indivíduos praticantes de exercício físico aumenta a fosforilação de alvos intracelulares de mTOR, como a 4E-BP1 no músculo vasto lateral. Além disso, as vias de sinalização intracelular mediadas por AKT e por mTOR parecem estar envolvidas também na transcrição da enzima creatina cinase em células C2C12 estimuladas com insulina

(SUMITANI *et al.*, 2002). Por fim demonstrou-se que a funcionalidade do transportador de creatina é dependente da atividade de mTOR (SHOJAIEFARD *et al.*, 2006). Segundo nossa revisão bibliográfica, é a primeira vez que um estudo demonstra a relação direta entre o aumento nos níveis de p-mTOR e a suplementação aguda com creatina no hipocampo de camundongos fêmeas, sendo que esse aumento de fosforilação pode estar diretamente correlacionado com um efeito tipo-antidepressivo em um modelo de depressão.

Em nosso trabalho escolhemos trabalhar exclusivamente com fêmeas, principalmente devido ao fato de que a cada ano, mais mulheres são diagnosticadas com depressão do que homens (HOLDEN, 2005; KESSLER *et al.*, 2005; STEINER *et al.*, 2005; MEHTA *et al.*, 2013). Em particular, as mulheres são mais propensas a sofrer depressão e ansiedade durante períodos em que os níveis de hormônios sexuais femininos (estrogênio e progesterona) estão baixos, como o período pré-menstrual, pós parto e menopausa (DOUMA *et al.*, 2005). Além dessa questão hormonal, diferenças sexuais pronunciadas são presentes também na anatomia cerebral, e que podem explicar a vulnerabilidade feminina à depressão (COSGROVE *et al.*, 2007; KESSLER, 2005). Apesar disso, em ambos os sexos, o tratamento permanece o mesmo, sem diferenças na medicação antidepressiva, bem como dose, um agravante que é adicionado ao fato de que esses antidepressivos levam semanas e até meses para melhorar os sintomas dos pacientes, com uma remissão significativa em apenas um terço deles (TRIVEDI *et al.*, 2006). Estudos ainda demonstram que a função e expressão da creatina cinase é diferente entre gêneros em humanos, com níveis e atividade menores em mulheres do que homens, em virtude da massa muscular predominante

em homens (MELTZER, 1971; WONG *et al*, 1983; GLEDHILL *et al*, 1988; RAMIREZ e JIMENEZ, 2002). Além disso, níveis diminuídos de ATP em mulheres depressivas, ao contrário de homens, têm sido associado com a resposta ao tratamento (RENSHAW *et al* , 2001) sugerindo que a creatina pode ser mais benéfica para o tratamento de fêmeas deprimidas (ALLEN *et al.*, 2010, 2012). No estudo de ALLEN *et al.*, (2010), é demonstrado que fêmeas suplementadas com creatina apresentam uma maior resistência quando submetidas ao estresse de natação forçada comparada aos machos que são suplementados com a mesma quantidade de creatina. No que se refere a cetamina, a maioria dos estudos pré-clínicos foram realizados com ratos machos (LI *et al.*, 2010, 2011; AUTRY *et al.*, 2011), embora um estudo demonstrou que fêmeas são muito mais sensíveis à cetamina com doses que não chegam a fazer efeito em ratos machos (CARRIER e CABBAJ *et al.*, 2013). Nosso estudo demonstrou que as fêmeas submetidas ao tratamento tanto com cetamina quanto com creatina no modelo de depressão apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade no TSC. Esse efeito foi observável em vários experimentos, com boa reprodutibilidade, embora não tenha sido possível realizar as devidas quantificações hormonais nessas fêmeas. Contudo, assume-se que as fêmeas alojadas em um mesmo compartimento passam a ciclar juntas, não observando-se assim diferenças quando aos níveis hormonais entre os animais de uma mesma caixa.

A finalidade primária deste estudo foi verificar se a creatina apresentava um efeito antidepressivo agudo e rápido no modelo de depressão induzido por corticosterona, assim como a cetamina. Os resultados demonstram que a creatina desempenha um efeito que pode

ser considerado agudo e rápido, na diminuição da imobilidade no TSC em animais submetidos ao tratamento crônico com corticosterona, esse efeito é pelo menos em parte, atribuído a via PI3K/Akt/mTOR, com consequente aumento do imunoconteúdo de proteínas, que estão associadas a uma regulação direta da neuroplasticidade no hipocampo. É importante ressaltar que apesar da cetamina já estar sendo utilizada na clínica como um antidepressivo de ação rápida, a sua utilização na rotina hospitalar é limitada, em virtude do potencial uso como droga de abuso, bem como possíveis efeitos psicomiméticos (KAVALALI e MONTEGGIA 2012). No entanto, a capacidade da cetamina para produzir uma resposta antidepressiva rápida e de longa duração em pacientes com depressão proporciona uma oportunidade única para a investigação dos mecanismos que medeiam estes efeitos comportamentais clinicamente relevantes. Dessa maneira esforços devem ser concentrados na pesquisa de fármacos que compartilhem vias chaves com a cetamina, como a via PI3K/Akt/mTOR compartilhada pela creatina, como apresentado neste trabalho.

## 7. CONCLUSÕES

A administração de corticosterona na dose de 20 mg/kg, p.o. por 21 dias é capaz de induzir um aumento de imobilidade no TSC sem causar alterações locomotoras no TCA, e também uma diminuição no tempo de auto-limpeza no teste de borrifagem de sacarose, caracterizando um bom modelo de indução de depressão em camundongos *Swiss* fêmeas.

Agudamente, tanto a cetamina (1 mg/kg, i.p.) quanto a creatina (10 mg/kg, p.o.) conseguem reverter o aumento de imobilidade induzido pela administração crônica de corticosterona no TSC, ao passo que a fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) não o faz. Não foram observadas alterações nos parâmetros locomotores em nenhum tratamento.

Tanto a creatina quanto a cetamina tem seus efeitos de diminuição da imobilidade no modelo de depressão anulados pela administração dos inibidores wortmanina (0,1 µg/sítio, i.c.v.) e rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.) mostrando que a via PI3K/Akt/mTOR pode estar envolvida no efeito tipo antidepressivo desses dois compostos. Não foram observadas alterações nos parâmetros locomotores em nenhum tratamento.

Os animais submetidos ao tratamento crônico com corticosterona tiveram os níveis séricos de corticosterona diminuídos comparado aos controles. Tanto o tratamento com creatina quanto com cetamina não foram capazes de alterar esses níveis de corticosterona circulante, indicando que esses compostos não parecem interferir nesses níveis para exercerem seus efeitos de anti-imobilidade.

Tanto a cetamina quanto a creatina foram capazes de aumentar o imunocontéudo de p-mTOR agudamente nos animais submetidos ao modelo de depressão.

Esses dados fornecem perspectivas preliminares e inovadoras, revelando que a creatina e a cetamina podem compartilhar alguns mecanismos de sinalização intracelular, incluindo o de vias rápidas, como a via PI3K/Akt/mTOR.

## 8. PERSPECTIVAS

Avaliar o efeito agudo dos animais tratados com creatina, fluoxetina e cetamina no teste de borrifagem de sacarose, hipofagia induzida pela novidade ou preferência pela sacarose em animais submetidos ao tratamento crônico com corticosterona.

Avaliar as alterações na expressão de PSD95, GLUR1, p70S6K, e níveis de BDNF no hipocampo de animais submetidos ao tratamento com creatina no modelo de depressão induzido por corticosterona.

Estudar a sinaptogênese dos animais tratados com creatina por meio de técnicas de microscopia *two-photon* ou microscopia eletrônica.

Verificar o papel dos receptores AMPA no efeito da creatina por meio do antagonista CNQX.

Verificar o papel da creatina na modulação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos mGLU2 e mGLU5.

Mensurar a atividade da creatina cinase e HEME-oxigenase 1, no hipocampo dos animais submetidos ao modelo da corticosterona e revertido por creatina e cetamina

Verificar o efeito da creatina usada em sinergismo com ampaquinas.

Verificar e quantificar as possíveis alterações na densidade de receptores de glicocorticóides.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELAIRA, H.M., *et al.* Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats. *Neurochem Int*, v. 59, p. 1163-74, 2011.

AGO Y., *et al.* Antidepressant-like effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU-43044 are associated with changes in prefrontal dopamine in mouse models of depression. *Neuropharmacology*, v. 55, p. 1355-63, 2008.

AISA, R., *et al.* Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats *Psychoneuroendocrinology*, v.32, p. 256–266, 2007.

ALFAREZ, D.N., *et al.* Corticosterone reduces dendritic complexity in developing hippocampal CA1 neurons. *Hippocampus*, v.19, p. 828–836; 2009.

ALLEN, P.J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci Biobehav Rev*, v. 36, p. 1442-62, 2012.

ALLEN, P.J. *et al.* Chronic creatine supplementation alters depression-like behavior in rodents in a sex-dependent manner. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, p. 534-46, 2010.

ALMEIDA, L.S. *et al.* Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse*, v. 60, p. 118-23, 2006.

AMARA S., FONTANA A. Excitatory amino acids transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem. Int.*, v. 41, p. 313-318, 2002.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4ed. Washington, DC, 1994.

AMITAL D., *et al.* Open study of creatine monohydrate in treatment-resistant posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*, v. 67, p. 836–837, 2006a.

AMITAL, D., *et al.* Observed effects of creatine monohydrate in a patient with depression and fibromyalgia. *Am J Psychiatry*, v. 163, p. 1840-1, 2006b.

ANDRES, R.H. Effects of creatine treatment on the survival of dopaminergic neurons in cultured fetal ventral mesencephalic tissue. *Neuroscience*, v. 133, p. 701-13, 2005.

ANDREWS P.W., *et al.* Blue again: perturbational effects of antidepressants suggest monoaminergic homeostasis in major depression. *Front Psychol.*, v. 2, p. 159, 2011.

ARMANINI, C., *et al.* Glucocorticoid endangerment of hippocampal neurons is NMDA-receptor dependent. *Brain Res.*, v. 532, p. 7–12, 1990.

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

AXELSON, D.A., *et al.* Hypercortisolemia and hippocampal changes in depression. *Psychiatry Res*, v. 47, p. 163–173; 1993.

BENJAMIN D., *et al.* Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 10, p. 868-880, 2011.

BERMAN R.M., *et al.* Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry*, v. 47, p. 351-354, 2000.

BERROCOSO E., ROJAS-CORRALES M.O., MICO J.A. Differential role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors on the antinociceptive and antidepressant effect of tramadol in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 188, p. 111-8, 2006.

BERTON, O., NESTLER, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, v. 7, p. 137-151, 2006.

BESSMAN, S.P., *et al.* Intimate coupling of creatine phosphokinase and myofibrillar adenosinetriphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 96, p. 1414-20, 1980.

BETTIO, L.E., *et al.* Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide cGMP and PI3K/mTOR pathways. *Behavioural Brain Research*, v. 234, p. 137-148, 2012.

BOERO, J., *et al.* Restricted neuronal expression of ubiquitous mitochondrial creatine kinase: changing patterns in development and with increased activity. *Mol Cell Biochem*, v. 244, p. 69-76, 2003.

BRAISSANT, O., *et al.* Creatine synthesis and transport during rat embryogenesis: spatiotemporal expression of AGAT, GAMT and CT1. *BMC Dev Biol*, v. 5, p. 9, 2005.

BRAISSANT, O., *et al.* Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 86, p. 193-201, 2001.

BRAISSANT, O. Creatine and guanidinoacetate transport at blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Inherit Metab Dis*, v. 35, p. 655-64, 2012.

BRAMBILLA P., *et al.* GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol. Psychiatry*, v. 8, p. 721-737, 2003.

BRAZIL DK, YANG Z, HEMMINGS BA. Advances in protein kinase B signaling: AKT ion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*, v. 29 p. 233-242, 2004,

BREWER G.J., WALLIMANN T.W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem.*, v74, p.1968-78, 2000.

BROCARD P.D.E., *et al.* Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol*, v. 598, p. 37-42, 2008.

BRUNELLO, N., *et al.* The role of noradrenaline and selective noradrenaline in depression. *Eur Neuropsychopharmacol*, v 12, p.461-75, 2002.

CANNAN R., SHORE A. The creatine-creatinine equilibrium: the apparent dissociation constants of creatine and creatinine. *Biochem J*, v. 22, p. 921-9, 1928.

CARRIER N., KABBAJ M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. *Neuropharmacology*, v. 70, p.27-34, 2013.

CASPI, A., *et al.* Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry*, v. 167, p. 509-527, 2010.

CASTELA E., *et al.* Topical corticosteroids in plaque psoriasis: a systematic review of risk of adrenal axis suppression and skin atrophy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2012.

CHEN B., *et al.* Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry*, v. 50, p. 260-265, 2001.

CHOURBAJI S., *et al.* IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiol Dis*, v. 23, p. 587-94, 2006.

CONRAD, C.D., *et al.* Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3

dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J. Neurosci*, v. 27, p. 8278–8285; 2007.

CORDOVA, F.M., *et al.* Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res.*, v. 998, p. 65-72, 2004.

COSGROVE K.P., MAZURE C.M., STALEY J.K. Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function, and Chemistry. *Biol. Psychiatry*, v. 62, p. 847–855, 2007.

COUTINHO V., KNÖPFEL T. Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist*, v. 8, p. 551-561, 2002.

COVVEY J.R., CRAWFORD A.N., LOWE D.K. Intravenous ketamine for treatment-resistant major depressive disorder. *Ann Pharmacother*, v. 46, p. 117-23, 2012.

CRYAN J.F., HOYER D., MARKOU A. Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. *Biol Psychiatry*, v. 54, p. 49-58, 2003.

CRYAN A., MARKOU I., LUCKI. Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs *Trends Pharmacol Sci*, v. 23, p. 238–245, 2002.

CRYAN J.F., MOMBЕРЕАU C., VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of

pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 29, p. 571-625, 2005.

CULLEN B.F., STOELTING R.K. *Clinical Anesthesia*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 312-27, 1997.

CUMMINGS J.L. The neuroanatomy of depression. *J. Clin. Psychiatry*, v. 11, p. 14-20, 1993.

CUNHA M.P., *et al.* Antidepressant-like effect of creatine in mice involves dopaminergic activation. *J Psychopharmacol*, v. 26, p. 1489-501, 2012.

CUNHA M.P., *et al.* The activation of  $\alpha$ 1-adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 44, p. 39-50, 2013b.

CUNHA M.P., *et al.* Evidence for the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. *Brain Res Bull*, v. 95, p.61-9, 2013a.

CUNHA, M.P., *et al.* . Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, p. 1913-20, 2008.

D'AQUILA, P.; BRAIN, P. F.L; WILLNER, P. Effects of chronic mild stress in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiol Behav*, v. 56, p. 861–867, 1994.

DA SILVA G.L., *et al.* Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *NeuroReport*, v. 11, p. 3699-3702, 2000.

DASH AK, MILLER DW, HUAI-YAN H,. Evaluation of creatine transport using Caco-2 monolayers as an in vitro model for intestinal absorption. *J Pharm Sci*, v. 90, p. 1593-8, 2001.

DAVID, D.J., *et al.* Neurogenesis-dependent and independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*. v. 62, p. 479-93, 2009.

DELDICQUE L., *et al.* Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc*, v. 37, p. 731-6, 2005.

DELDICQUE L, *et al.* Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 293 p. 1263-71, 2007.

DEMANT, T. W.; RHODES, E. C. Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Med*, v. 28, p. 49-60, 1999.

DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL IV (DSM-IV)  
American Psychiatric Press, Washington, D.C. 2000.

DICK, D.M., RILEY, B., KENDLER, K.S. Nature and nurture in neuropsychiatric genetics: where do we stand? *Dialogues Clin Neurosci*, v. 12, p. 7-23, 2010.

DONG X.X., WANG Y., QIN Z.H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* v. 30, p. 379-387, 2009.

DOUMA, S.L., *et al.* Estrogen-related mood disorders: reproductive life cycle factors *ANS. Adv. Nurs. Sci.*, v. 28, p. 364-375, 2005.

DREVETS W., FUREY M.L., Replication of scopolamine's antidepressant efficacy in major depressive disorder: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Biol. Psych.*, v. 67, p. 432-438, 2010.

DREVETS W.C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 11, p. 240-249, 2001.

DREVETS W.C., *et al.* A functional anatomical study of unipolar depression. *J. Neurosci.*, v. 12, p. 3628-3641, 1992.

DREVETS, W.C., *et al.* Glucose metabolism in the amygdala in depression: relationship to diagnostic subtype and plasma cortisol levels. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 71, p. 431-47, 2002.

DUBOVISKY, S.L., DUBOVISKY, A.N. Transtornos do humor. *ARTMED*, 2004.

DUCOTTET, C., BELZUNG, C. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiology & Behavior*, v. 81, p. 417-426, 2004.

DUMAN R.S., *et al.* Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology*, v.62, p. 35-41, 2012.

DUMAN R.S., LI N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012.

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

DUMAN, R.S., MONTEGGIA, L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, v. 59, p. 1116-27, 2006.

DUNN A.J., SWIERGIEL A.H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 81, p.688-93, 2005.

DWIVEDI Y., *et al.* Lower phosphoinositide 3-kinase (PI3-kinase) activity and differential expression levels of selective catalytic and regulatory PI 3-kinase subunit isoforms in prefrontal cortex and hippocampus of suicide subjects. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, p. 2324–2340, 2008.

EISSA AHMED A.A., AL-RASHEED N.M., AL-RASHEED N.M. Antidepressant-like effects of rosiglitazone, a PPAR $\gamma$  agonist, in the rat forced swim and mouse tail suspension tests. *Behav Pharmacol*, v. 20, p. 635–642, 2009.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 28, p. 435-51, 2004.

ESTEVEES, F.C.; GALVAN, A.L. Depressão numa contextualização contemporânea. *Aletheia: revista do curso de psicologia, Canoas*, v. 24, p., 2006.

FISAR Z, HROUDOVÁ J. Intracellular signaling pathways and mood disorders. *Folia Biol.*, v. 56, p. 135-148, 2010.

GARCIA J.B.S. Cetamina uma nova leitura. *Prática Hospitalar*, v. 53, p. 214-6, 2007.

GARCIA L.S., *et al.* Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hi-ppocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, p. 140–4, 2008.

GENIUS, J. *et al.* Creatine protects against excitotoxicity in an in vitro model of neurodegeneration. *PLoS One*, v. 7, p. e30554, 2012.

GENIUS, J. *et al.* . Creatine protects against excitotoxicity in an in vitro model of neurodegeneration. *PLoS One*, v. 7, p. e30554, 2012.

GLABE R.S. Acute toxic effects of club drugs. *J Psych Drugs*, v. 36, p. 303-13, 2004.

GLEDHILL R.F., *et al.* Race-gender differences in serum creatine kinase activity: a study among South Africans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 51, p. 301–304, 1988.

GONÇALES, C.A.V., MACHADO, A.L. Depressão, o mal do século: de que século? *Revista Enfermagem da UERJ*, Rio de Janeiro, v. 15, p. 298-304, 2007.

GOURLEY S.L., TAYLOR J.R. Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, v.9, p. 9-32, 2009.

GOURLEY, S.L., *et al.* Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. *Biol. Psychiatry*, v. 64, p.884–890; 2008.

GREEN S.M., LI J. Ketamine in adults: what emergency physicians need to know about selection and emergence reactions. *Acad Emerg Med*, v. 7, p. 278–81, 2000.

GREENHAFF, P.L. Creatine supplementation: recent developments. *Br J Sports Med*, v. 30, p. 276-7, 1996.

GREGUS, A.J., *et al.* Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav. Brain Res.*, v. 156, p. 105–114, 2005.

GUTIÉRREZ-GARCÍA, A.G., CONTRERAS, C.M. Stressors can affect immobility time and response to imipramine in the rat forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 91, p. 542-8, 2008.

HANADA M., FENG J., HEMMINGS B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT -a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* v. 1697, p 3–16, 2004.

HARKIN A.J., BRUCE K.H., CRAFT B. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. Acute treatments are active in the forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 372, p. 207-213, 1999.

HARKIN A.J., *et al.* Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacol.*, v. 44, p. 616-623, 2003.

HELLSTEN, J., *et al.* Electroconvulsive seizures increase hippocampal neurogenesis after chronic corticosterone treatment. *Eur. J. Neurosci.*, v. 16, p.283–290; 2002.

HEMELRIJCK J.V, WHITE P. Opioid Intravenous Anesthesia. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK (eds.). *Clinical Anesthesia*. 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 312-27, 1997.

HOEFFER C.A., KLANN E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci.*, v. 33, p. 67-75, 2010.

HOLDEN, C. Sex and the suffering brain. *Science*, v. 308, p. 1574, 2005.

HOLTMAAT A., SVOBODA K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 10, p. 647-658, 2009.

HOU L, KLANN E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for

metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci*, v. 24, p. 6352-61, 2004.

HOWELL K.R., KUTIYANAWALLA A., PILLAI A. Long-term continuous corticosterone treatment decreases VEGF receptor-2 expression in frontal cortex. *PLoS One.*, v. 6, p. e20198, 2011.

INOUE, T.; KOYAMA, T. Effects of acute and chronic administration of highdose corticosterone and dexamethasone on regional brain dopamine and serotonin metabolism in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, v. 20, p. 147–156, 1996.

JAKSCH W., *et al.* Perioperativesmall-dose S(+)-ketamine has no incremental beneficial effects on postoperative pain when standard-practice opioid infusions are used. *Anesth Analg*, v. 94, p. 981-6, 2002.

JOHNSON, N.M., FOURNIER, L.E., KALYNCHUK. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor*Behav. Brain Res.*, v.168, p. 280–288, 2006.

JURAVLEVA E. *et al.* Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glia cells, modulates Ras/NF-kappaB signaling, and increases the generation of reactive oxygen species. *J Neurosci Res*, v. 79, p.224-30, 2005.

KALUEFF, A.V. Grooming and stress. KSF Publishers, Kiv., p. 148, 2002.

KALUEFF, A.V.; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, v. 13, p. 151-158, 2004.

KAREGE *et al.* Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3beta in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry*, v. 61, p. 240-245, 2007.

KAREGE F., *et al.* Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v. 136, p. 29-37, 2005.

KARISHMA, K. K.; HERBERT, J. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur. J. Neurosci.* v. 16, p. 445–453, 2002.

KASTER M.P., *et al.* Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice. *Neuropharmacology*, v. 62, p. 419-426, 2011.

KASTER, M.P. *et al.* Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur J Pharmacol*, v. 565, p. 119-24, 2007.

KATO, T., *et al.* Brain phosphorous metabolism in depressive disorders detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord*, v. 26, p. 223-30, 1992.

KATO, T. *et al.* Reduction of brain phosphocreatine in bipolar II disorder detected by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *J Affect Disord*, v. 31, p. 125-33, 1994.

KATYARE, S. BALASUBRAMANIAN, D.V. PARMAR Effect of corticosterone treatment on mitochondrial oxidative energy metabolism in developing rat brain *Exp. Neurol.*, v.183 p. 241–248, 2003.

KAVALALI E.T., MONTEGGIA L.M. Synaptic mechanisms underlying rapid antidepressant action of ketamine. *Am J Psychiatry*, v. 169, p.1150-6, 2012.

KELLY A., LYNCH M.A. Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology*, v. 39, p. 643–651, 2000.

KENNEDY, S.H., *et al.* Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. *Am J Psychiatry*, v. 158, p. 899-905, 2001.

KESSLER R.C., *et al.* Prevalence and treatment of mental disorders, 1990 to 2003. *N Engl J Med*, v. 352, p. 2515-23, 2005.

KIEFER G., *et al.* Effects of amitriptyline, amitriptylinoxide, doxepine and clozapine on N-methyl-D-aspartate-evoked release of [3H]-acetylcholine in rat caudatoputamen. *Arzneimittelforschung*, v. 49, p. 820-3, 1999.

KOHR S., DURIEUX M.E. Ketamine: Teaching an Old Drug New Tricks. *Anesth Analg*, v. 87, p. 1186-93, 1998.

KOIKE H., IJIMA M., CHAKI S. Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. *Behav Brain Res*, v. 224, p. 107-11, 2011.

KONDO, D.G. *et al.* Open-label adjunctive creatine for female adolescents with SSRI-resistant major depressive disorder: a 31-phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. *J Affect Disord*, v. 135, p. 354-61, 2011.

LAURETTI GR, *et al.* Avaliação clínica dos efeitos hemodinâmicos, analgésicos, psicodélicos e de bloqueio neuromuscular da cetamina racêmica e de seu S(+) isômero. *Rev Bras Anesthesiol*, v. 50, p.357-62, 2000.

LEAL, *et al.* Lead-stimulate p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 178, p. 44-51, 2002.

LI N., *et al.* mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, v. 329, p. 959-64, 2010.

LI N., *et al.* Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry*, v. 69, p. 754-61, 2011.

LICINIO, J., MASTRONARDI, C., WONG, M. L. Pharmacogenomics of neuroimmune interactions in human psychiatric disorders. *Exp Physiol*, v. 92, p. 807-11, 2007.

LIPSKAYA, T. *et al.* Studies of the interaction of mitochondrial creatine kinase with the mitochondrial membrane. *Adv Myocardiol*, v. 3, p. 597-611, 1982.

LIPTON S.A., ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Eng. J. Med.*, v. 330, p. 613-622, 1994.

LIU R.J, AGHAJANIAN G.K. Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, v. 359-64, 2008.

LOFTIS J.M., HUCKANS M., MORASCO B.J. Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies. *Neurobiol Dis*, v. 37, p. 519-33, 2010.

LOSCHER W., ANNIES R., HONACK, D. The N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 induces increases in dopamine and serotonin metabolism in several brain regions. *Neurosci. Lett.*, v. 128, p. 191-194, 1991.

LOWY M.T., WITTENBERG L., YAMAMOTO B.K. Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. *J. Neurochem.*, v. 65, p. 268-274, 1995.

LUDKA, F.K. *et al.* Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 23, p. 400-12, 2013.

LUFT A, MENDES FF. S(+) Cetamina em Baixas Doses: Atualização. Rev Bras Anesthesiol, v. 55, p.460- 9, 2005.

LYOO, I.K., *et al.* A randomized, double-blind placebo-controlled trial of oral creatine monohydrate augmentation for enhanced response to a selective serotonin reuptake inhibitor in women with major depressive disorder. Am J Psychiatry, v. 169, p. 937-945, 2012.

MACHADO-VIEIRA R., MANJI H.K., ZARATE C.A. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology and therapeutics of mood disorders. Neuroscientist, v. 15, p. 525-539, 2009.

MACQUEEN G., *et al.* Posterior hippocampal volumes are associated with remission rates in patients with major depressive disorder. Biol. Psych., v. 64, p. 880-883, 2008.

MAENG S., *et al.* Interferon-  $\alpha$  increases immobility in the forced swimming test in rats. Psychopharmacology, v.148, p.106–110, 2000.

MAENG S., *et al.* Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. Biol Psychiatry, v. 63, p. 349-52, 2008.

MAES M., *et al.*, Serum levels of excitatory aminoacids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsivity. Acta Psychiatr. Scand., v. 97, p. 302-308, 1998.

MAGARIÑOS, A.M.; VERDUGO, J.M.; MCEWEN, B.S. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 14002-14008, 1997.

MAGARIÑOS, B.S. MCEWEN. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, 69, pp. 89–98, 1995.

MAKINO, M., *et al.* Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. *Eur. J. Pharmacol*, v.356, p. 1–7, 1998.

MAKINO, M., *et al.* Interferon-a increases immobility in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*148,106–110, 2000.

MATTSON, M.P.; GLEICHMANN, M.; CHENG, A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*, v. 60, p. 748-66, 2008.

MAURI M.C., *et al.* Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. *Neuropsychobiology*, v. 37, p. 124-129, 1998.

MAYBERG H.S. Positron emission tomography imaging in depression: a neural systems perspective. *Neuroimaging Clin. N. Am.*, v. 13, p. 805-815, 2003.

McARTHUR, R., BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 84, p. 436-452, 2006.

McEWEN B. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 583, p. 174-185, 2008.

McEWEN B.S., *et al.*, Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*, v. 62, p. 3-12, 2012.

MEHTA N.S., WANG L., REDEI E.E. Sex differences in depressive, anxious behaviors and hippocampal transcript levels in a genetic rat model. *Genes Brain Behav.* 2013.

MELDRUM B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, v. 130, p.1007S-15S, 2000.

MELTZER H.Y. Factors affecting serum creatine phosphokinase levels in the general population: the role of race, activity and age. *Clin Chim Acta* v. 33, p. 165–172, 1971.

MITANI H., *et al.* Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 30, p. 1155-1158, 2006.

MORALES-MEDINA, J., *et al.* Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus

accumbens and amygdala in the rat. *J. Chem. Neuroanat*, v. 38, p. 266–272; 2009.

MORETTI A., GORINI A. e VILLA R.F. Affective disorders, antidepressant drugs and brain metabolism. *Mol Psychiatry*, v.8, p.773-85, 2003.

MORETTI M., *et al.* Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res*, v. 46, p. 331-40, 2012.

MORRISON J.H., BAXTER M.G. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosc*, v. 13, p.240-50, 2012.

NAKASHIMA, T., *et al.* Evidence for creatine biosynthesis in Muller glia. *Glia*, v. 52, p. 47-52, 2005.

NASH S.R., *et al.*, Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels*, v. 2, p.165-74, 1994.

NASH, S.R., *et al.* Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels*, v. 2, p. 165-74, 1994.

NEMEROFF, C.B. Prevalence and management of treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*, v. 68, p. 17-25, 2007.

NEMEROFF, C.B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *J Psychiatr Res*, v. 41, p. 189-206, 2007.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci*, v. 5, p. 1068-1070, 2002.

NEMETA, B., LEVINE, J. A pilot dose-finding clinical trial of creatine monohydrate augmentation to SSRIs/SNRIs/NASA antidepressant treatment in major depression. *Int Clin Psychopharmacol*, v. 28, p. 127-133, 2013.

NERY, F.G., *et al.* Normal metabolite levels in the left dorsolateral prefrontal cortex of unmedicated major depressive disorder patients: a single voxel (1)H spectroscopy study. *Psychiatry Res*, v. 174, p. 177-83, 2009.

NESTLER E.J. e HYMAN S.E. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, v. 13, p. 1161-9, 2010.

NESTLER, E.J., *et al.* Neurobiology of depression. *Neuron*, v. 34, p. 13-25, 2002.

NESTLER, E.J., CARLEZON, W. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*, v. 59, p. 1151-9, 2006.

O'KEANE V., FRODL T., DINAN T.G. A review of Atypical depression in relation to the course of depression and changes in HPA axis organization. , v. 37, p.1589-99, 2012.

OLIVEIRA, C.S., *et al.* The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 26, p. 355-362, 2008.

PETERSON G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem.*, v. 83, p. 346-356. 1977.

PITTENGER, C., DUMAN, R.S. Stress, Depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacol.*, v. 33, p. 88-109, 2008.

PLENNINGER E.G., DURIEUX M.E., HIMMELSEHER S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers. *Anesthesiol.*, v. 96, p. 357-66, 2002.

PLENNINGER E.G, DURIEUX M.E, HIMMELSEHER S. Cognitive impairment after small-dose ketamine isomers in comparison to equianalgesic racemic ketamine in human volunteers. *Anesthesiol.*, v. 96, p. 357-66, 2002.

POON V.Y., CHOI S., PARK M. Growth factors in synaptic function. *Front Synaptic Neurosci.*, v. 5, p. 6, 2013.

POPOLI M., *et al.* The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci.*, v. 13 p. 22-37, 2011.

PORSOLT R.D., BERTIN A., JALFRE M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, v. 229, p. 327-336, 1977.

POSSER T., *et al.* Exposure of C6 glioma cells to PB (II) increases the phosphorylation of p38 (MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch Toxicol.*, v. 81, p. 407-414, 2007.

POST, R.M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatry*, v. 149, p. 999-1010, 1992.

QIU, G., *et al.* Modulation of the suppressive effect of corticosterone on adult rat hippocampal cell proliferation by paroxetine. *Neurosci. Bull*, v. 23, p. 131-136; 2007.

RADLEY J.J., MORRISON J.H. Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Res Rev*, v. 4, p. 271-87, 2005.

RAINER Q., *et al.* Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 8, p.1-15, 2011.

RAMIREZ O., JIMENEZ E. Sexual dimorphism in rat cerebrum and cerebellum: different patterns of catalytically active creatine kinase isoenzymes during postnatal development and aging. *Int J Devl Neuroscience*, v. 20, p. 627-639, 2002.

RENSHAW P.F., *et al.* Multinuclear magnetic resonance spectroscopy studies of brain purines in major depression. *Am J Psychiatry*, v. 158, p. 2048–2055, 2001.

REZIN, G.T., *et al.* Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int*, v. 53, p. 395-400, 2008.

RODRIGUES, A.L. *et al.* Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol*, v. 79, p. 150-6, 1996.

ROITMAN, S., *et al.* Creatine monohydrate in resistant depression: a preliminary study. *Bipolar Disord*, v. 9, p. 754-758, 2007.

ROSA A.O., *et al.* Antidepressant-like effect of the novel thiazolidinone NP031115 in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, p. 1549-1556, 2008.

ROSA A.O., *et al.* NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res*, v. 144, p. 87–93, 2003.

SANACORA *et al.* Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 7, p. 426-437, 2008.

SANACORA G., *et al.* Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch Gen Psychiatry*, v. 61, p. 705-13, 2004.

SANACORA G. Glutamatergic agents represent a new class of antidepressant drugs? Part 1. *J. Clin. Psychiatry*, v. 70, p. 1473-1475, 2009.

SANACORA G., *et al.* Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 7, p. 426-437, 2008.

SAPOLSKY, R. R. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*, v. 57, p. 925-929, 2000.

SARANDOL A., *et al.* Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative- antioxidant systems. *Hum Psychopharmacol*, v. 22, p. 67-73, 2007.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, v. 122, p. 509-522, 1965.

SCHMIDT H.D., BANASR M., DUMAN R.S. Future Antidepressant Targets: Neurotrophic Factors and Related Signaling Cascades. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.*, v. 5, p. 151-156, 2008.

SEAL R.P., AMARA S.G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 39, p. 431-456, 1999.

SEVERINO P.C., *et al.* Cell signaling in NMDA preconditioning and neuroprotection in convulsions induced by quinolinic acid. *Life Sci*, v. 89, p. 570-576, 2011.

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

SHELIN, Y.I *et al.* Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p. 3908-3913, 1996.

SHOJAIEFARD, M.; CHRISTIE, D. L.; LANG, F. Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinase mTOR. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 341, p. 945-9, 2006.

SKOLNICK P. AMPA receptors: a target for novel antidepressants? v. 63, p. 347-8, 2008.

SKOLNICK P. Antidepressants for the new millennium. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 375, p. 31-40, 1999.

SKOLNICK P., POPIK P., TRULLAS R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol. Sci.*, v. 30, p. 563-569, 2009.

SORA, I.; NISHIMON, K.; OTSUKI, S. Dexamethasone suppression test and noradrenergic function in affective and schizophrenic disorders. *Biol Psychiatry*, v. 21, p. 621-31, 1986.

STEINER, M., *et al.* Gender differences in clinical presentation and response to sertraline treatment of generalized anxiety disorder. *Hum Psychopharmacol*, v. 20, p. 3-13, 2005.

STERU L., *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, p. 367-370, 1985.

SUI, L.; WANG, J.; LI, B.M. Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn Mem*, v. 15, p. 762-76, 2008.

SUMITANI S., *et al.* Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Endocrinology*, v. 143, p. 820-8, 2002.

TACHIKAWA, M., *et al.* A novel relationship between creatine transport at the blood-brain and blood-retinal barriers, creatine biosynthesis, and its use for brain and retinal energy homeostasis. *Subcell Biochem*, v. 46, p. 83-98, 2007.

TACHIKAWA, M., *et al.* Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci*, v. 20, p. 144-60, 2004.

TEIXEIRA, M.A.R. Melancolia e depressão: um resgate histórico e conceitual na psicanálise e na psiquiatria. *Revista de Psicologia da UNESP*, v. 4, 2005.

TOKER A. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol. Pharmacol.*, v. 57, p. 652-658, 2000.

TRIVEDI M.H., *et al.* Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N Engl J Med*, v. 354, p. 1243-52, 2006.

TWORT F., MELLANBY E. On creatine-destroying Bacilli in the intestine and their isolation. *J Physiol*, v. 44, p. 43-9, 1912.

VENKATRAMAN, T.N. *et al.* Biochemical abnormalities of the medial temporal lobe and medial prefrontal cortex in late-life depression. *Psychiatry Res*, v. 172, p. 49-54, 2009.

VERKHRATSKY A, KIRCHHOFF F. Glutamate-mediated neuronal-glial transmission. *J Anat*, v. 210, p. 651-660, 2007.

VÉZINA C., KUDELSKI A., SEHGAL S. N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.*, v. 28, p. 721-726, 1975.

VIEIRA, K.F.L. Depressão e suicídio: uma abordagem psicossomática no contexto acadêmico. Dissertação (Mestrado em Psicologia Social) – Centro de Ciências Humanas, Artes e Letras, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

VILPOUX C., *et al.* Differential effects of chronic antidepressant treatments on  $\mu$  and  $\delta$ -opioid receptors in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 443, p. 85-93, 2002.

WALKER, J.B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, v. 50, p. 177-242, 1979.

WATANABE, *et al.* Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus*, v. 2, p. 431–435; 1992.

WILLIAMS, M.H., *et al.* Creatine: The power supplement. Human Kinetics Publishers, 1999.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 134, p. 319–29, 1997.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*, v.16, p.525–34, 1992.

WIXOM R.L., DAVIS G.E., FLYNN M.A. Excretion of creatine and creatinine in feces of man. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 161, p. 452-7, 1979.

WONG E.T., *et al.* Heterogeneity of serum creatine kinase activity among racial and gender groups of the population. *Am J Clin Pathol*, v. 79, p. 582–586, 1983.

WONG, M.L., LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*, v. 2, p. 343-51, 2001.

WOOLLEY, C. S., GOULD, E., MCEWEN, B. S. Exposure to 36. excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res*, v. 531, p. 225–231; 1990.

WU T.C., *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents chronic corticosterone induced depression-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, p. 871-83, 2013.

WYSS, M., KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*, v. 80, p. 1107-213, 2000.

YALCIN, I., AKSU, F., BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *European Journal Pharmacology*, v. 514, p. 165-74, 2005.

YAMADA J, SUGIMOTO Y, YAMADA S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol.*, v. 504, p. 207-211, 2004.

YANG P.C., *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. *J Biol Chem*, v. 283, p. 2631-43, 2008.

YOSHIHARA Y., DE ROO M., MULLER D. Dendritic spine formation and stabilization. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 19, p. 146-153, 2009.

ZARATE C.A., *et al.* Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. *Psychopharmacol. Bull.*, v. 36, p. 35-83, 2002.

ZARATE *et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry*, v. 63, p. 856-64, 2006.

ZHAO *et al.* A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *Eur J Pharmacol*, v. 581, p. 113-20, 2008.

ZHAO, *et al.* Effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. *Brain Res*, v. 1261, p. 82–90, 2009.