

Luana Meller Manosso

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS
NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ZINCO EM
CAMUNDONGOS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de Doutora em
Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia
Severo Rodrigues

Florianópolis
2016

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

Manosso, Luana Meller
Investigação de mecanismos de ação envolvidos no efeito
tipo-antidepressivo do zinco em camundongos / Luana Meller
Manosso ; orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues -
Florianópolis, SC, 2016.
254 p.

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

Inclui referências

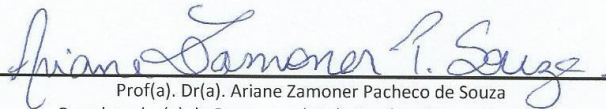
1. Bioquímica. 2. Depressão. 3. Zinco. 4. Vias de
sinalização. 5. Glutamato. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Investigação de mecanismos de ação envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do zinco em camundongos"

Por

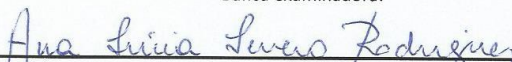
Luana Meller Manosso

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (015/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

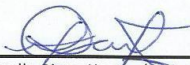


Prof(a). Dr(a). Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:



Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



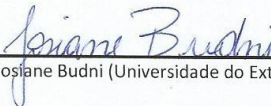
Dr(a) Manuella Pinto Kaster (Universidade Federal de Santa Catarina)



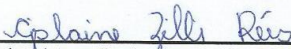
Dr(a) Alcir Luiz Dafre (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Débora Venske (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense)



Dr(a) Gislaïne Zilli Réus (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

Florianópolis, 19 de Maio de 2016.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antoninho e Mara, por contribuírem com a formação do meu caráter, pelo amor incondicional, compreensão e paciência nos momentos difíceis e pelo aporte financeiro e psicológico. Sem vocês, não teria conseguido chegar até aqui!

Ao meu noivo, Gabriel pelo amor, companheirismo, compreensão nos momentos de ausência e incentivo constante. Você foi muito importante nessa caminhada!

Ao meu irmão Angelo, à minha cunhada Lais, aos meus avôs Elio e Zulma e à família do Gabriel por estarem juntos todos esses anos.

À minha orientadora Ana Lúcia, pela confiança, orientação, ensinamentos e amizade de todos esses anos. Serei eternamente grata!

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia da depressão com os quais pude conviver durante o doutorado: Aline, André, Anna, Andiará, Camille, Daiane, Dayane, Fernanda, Francis, Julia, Luis, Mauren, Maurício, Morgana, Pâmilla, Priscila, Vicente e Vivian. Obrigada pelo convívio, discussões e troca de conhecimentos. Um agradecimento especial àqueles que ajudaram nos experimentos: André, Camille, Julia, Maurício e Morgana. A ajuda de vocês foi essencial!

Aos professores Rodrigo e Carla, pela colaboração nessa tese, e aos seus alunos Filipe e Tharine. Aos demais professores, colegas e funcionários dos programas de pós-graduação de bioquímica e neurociências pelos ensinamentos, auxílios e discussões em disciplinas. Um agradecimento especial aos professores Alcir, Andreza, Manuella, Marcelo e Patrícia e aos colegas Ana Paula, Bettina, Giane e Marco.

Às minhas amigas, perto ou longe, juntos. Em especial a Carla, Bruna, Débora, Fernanda, Gabriela, Karina, Lais, Pâmela, Samara, e Talita. Obrigada pelo apoio e amizade de sempre!

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desta etapa.

RESUMO

Várias estratégias nutricionais estão sendo propostas para melhorar o tratamento da depressão. Um potencial nutracêutico é o zinco, que se destaca por ter estudos pré-clínicos e clínicos mostrando benefício na depressão. Entretanto, os mecanismos de ação do zinco não são totalmente esclarecidos. Dessa forma, os principais objetivos do trabalho foram analisar a participação de algumas vias de sinalização intracelular no efeito tipo-antidepressivo do zinco em camundongos submetidos ao teste de suspensão pela cauda (TSC) e verificar o efeito do estresse crônico imprevisível sozinho ou associado com o zinco em parâmetros que envolvem a neurotransmissão glutamatérgica. Os principais resultados dos experimentos agudos foram: (a) administração de inibidores de várias cinases, especificamente inibidor da proteína cinase A (PKA - H-89), inibidor da proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CAMKII - KN-62), inibidores da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) cinase (MEK1/2 - PD98059 e U0126), inibidor da proteína cinase C (PKC - queleritrina), inibidor da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K - LY294002), inibidor da heme oxigenase-1 (HO-1, protoporfirina de zinco (ZnPP)) ou antagonista do receptor tropomiosina cinase B (TrkB - K-252a) aboliu o efeito tipo-antidepressivo do cloreto de zinco ($ZnCl_2$ - 10 mg/kg, p.o.); (b) coadministração de doses subefetivas do $ZnCl_2$ (1 mg/kg, p.o.) com inibidor da glicogênio sintase cinase 3β (GSK- 3β - AR-A014418) ou com indutor da HO-1 (protoporfirina de cobalto (CoPP)) propiciou um efeito sinérgico na diminuição do tempo de imobilidade; (c) a administração aguda de $ZnCl_2$ (10 mg/kg, p.o.) não alterou a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) e o imunocontéudo do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) nem no hipocampo e nem no córtex pré-frontal. Entretanto, essa mesma dose de $ZnCl_2$ aumentou o imunocontéudo da HO-1 no córtex pré-frontal mas não no hipocampo. Em relação aos experimentos crônicos, os principais resultados foram: (d) tratamento com $ZnCl_2$ ou com fluoxetina (ambos a 10 mg/kg, p.o., 7 dias) impediu o efeito tipo-depressivo induzido pelo protocolo de estresse crônico imprevisível (14 dias); (e) nenhuma alteração no imunocontéudo hipocampal de proteínas envolvidas na neurotransmissão glutamatérgica, especificamente GLT-1, proteína glial fibrilar ácida (GFAP) ou na fosforilação da proteína cinase B (Akt) foi observada em qualquer grupo experimental; (f) imunocontéudo hipocampal do EACC1 foi aumentado em camundongos estressados tratados com $ZnCl_2$, fluoxetina ou veículo e em animais não

estressados tratados com $ZnCl_2$ ou fluoxetina; (g) imunocontéudo hipocampal da Akt foi aumentado em camundongos estressados e naqueles tratados com $ZnCl_2$ (estressados ou não estressados); (h) experimento *ex vivo* realizado com as fatias hipocampais demonstrou que as fatias expostas ao glutamato (10 mM) tinham diminuição na viabilidade celular, mas nem o protocolo de estresse e nem os tratamentos realizados previamente alteraram esse resultado. Em conjunto, esses resultados indicam que o efeito tipo-antidepressivo do zinco é dependente, pelo menos em parte, de vias de sinalização intracelular que podem ativar o BDNF e a HO-1, e que o zinco também pode modular proteínas envolvidas com a neurotransmissão glutamatérgica. Assim, os resultados expandem os dados da literatura sobre possíveis mecanismos desse nutriente na melhora dos sintomas depressivos.

Palavras-chaves: Zinco. Depressão. Antidepressivo. Vias de sinalização. Glutamato. Teste de suspensão pela causa. Estresse crônico imprevisível.

ABSTRACT

Several nutritional strategies are being proposed to improve clinical outcomes in depression. One potential nutraceutical is zinc, which stands out for having pre-clinical and clinical studies showing benefit in depression. However, zinc mechanisms of action are not fully understood. Thus, the main objectives of this study were to analyze the participation of some intracellular signaling pathways in zinc antidepressant-like effect in mice subjected to tail suspension test (TST) and verify the effect of chronic unpredictable stress alone or in combination with zinc on parameters involving glutamatergic neurotransmission. The main results of the acute experiments were: (a) administration of several kinase inhibitors, especially protein kinase A inhibitor (PKA - H-89), Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase inhibitor (CaMKII - KN-62), extracellular-regulated protein kinase (ERK) kinase inhibitors (MEK1/2 - PD98059 and U0126), protein kinase C inhibitor (PKC - chelerythrine), phosphoinositide 3-kinase inhibitor (PI3K - LY294002), heme oxygenase-1 inhibitor (HO-1, zinc protoporphyrin (ZnPP)) or antagonist of tropomyosin-related kinase B receptor (TrkB - K-252a) abolished the antidepressant-like effect of zinc chloride (ZnCl₂ - 10 mg/kg, p.o.); (b) coadministration of sub-effective doses of ZnCl₂ (1 mg/kg, p.o.) with glycogen synthase kinase 3 β inhibitor (GSK-3 β - AR-A014418) or HO-1 inducer (cobalt protoporphyrin (CoPP)) afforded a synergistic effect in the immobility time reduction; (c) acute administration of ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) did not alter the cAMP response element binding protein (CREB) phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) immunocontent in the hippocampus and prefrontal cortex. However, this same dose of ZnCl₂ increased HO-1 immunocontent in the prefrontal cortex, but not in the hippocampus. Regarding the chronic experiments, the main results were: (d) treatment with ZnCl₂ or fluoxetine (both 10 mg/kg, p.o., 7 days) prevented the depressant-like effect induced by the chronic unpredictable stress protocol (14 days); (e) no change in hippocampal immunocontent of proteins involved in glutamatergic neurotransmission, particularly GLT-1, glial fibrillary acidic protein (GFAP) or the phosphorylation of protein kinase B (Akt) was observed in any experimental group; (f) EACC1 hippocampal immunocontent was increased in stressed mice treated with ZnCl₂, fluoxetine or vehicle and non-stressed animals treated with ZnCl₂ or fluoxetine; (g) Akt hippocampal immunocontent was increased in stressed mice and those treated with ZnCl₂ (stressed or non-stressed); (h) *ex vivo* experiment

with hippocampal slices showed that the slices exposed to glutamate (10 mM) had decreased cell viability, but the previous exposition to stress protocol and the treatments did not alter this result. Together, these results indicate that the antidepressant-like effect of zinc is dependent, at least in part, on intracellular signaling pathways that can activate BDNF and HO-1, and that zinc may also modulate proteins involved in glutamatergic neurotransmission. Thus, the results extend literature data on the possible mechanisms underlying the improvement of depressive symptoms by zinc.

Keywords: Zinc. Depression. Antidepressant. Signaling pathways. Glutamate. Tail suspension test. Chronic unpredictable stress.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO / CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1. Hipótese monoaminérgica.....	29
Figura 2. Modelo simplificado do papel do estresse e da terapia com antidepressivos na expressão do BDNF, função hipocampal e humor..	34
Figura 3. Via de sinalização do BDNF.....	37
Figura 4. Localização dos principais EAATs no hipocampo	43
Figura 5. Eixo HPA	52
Figura 6. Alterações ocasionadas pelo estresse	55
Figura 7. Alterações hipocâmpais em resposta ao estresse	56
Figura 8. Vias de sinalização intracelular afetadas pelos antidepressivos e que culminam com a ativação do CREB e posterior aumento do BDNF	60
Figura 9. Ativação do fator de transcrição Nrf2.....	65
Figura 10. Distribuição do zinco no organismo humano.....	72
Figura 11. Homeostase do zinco nos neurônios	77
Figura 12. Transporte sináptico do zinco	79
Figura 13. Vias de sinalização envolvidas da ativação do receptor do zinco GPR39	82
Figura 14. Relação entre as concentrações de zinco livre e a viabilidade e função celular	84
Figura 15. Principais efeitos do zinco na depressão	96
Figura 16. Possíveis mecanismos de ação implicados no efeito tipo-antidepressivo do zinco verificados a partir de experimentos agudos ou de um modelo crônico de depressão (protocolo de estresse crônico imprevisível).....	177

CAPÍTULO I

Figura I.1. Diagrama do protocolo experimental	105
Figura I.2. Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	106
Figura I.3. Teste do campo aberto (TCA)	107
Figura I.4. Influência da inibição da PKA nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	110
Figura I.5. Influência da inibição da CAMKII nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	112
Figura I.6. Influência da inibição da PKC nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	114
Figura I.7. Influência da inibição da MEK1/2 (usando o PD98059) nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	115

Figura I.8. Influência da inibição da MEK1/2 (usando o U0126) nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	117
Figura I.9. Influência da modulação da PI3K nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	119
Figura I.10. Influência da modulação da GSK-3β nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	121
Figura I.11. Fosforilação do CREB e imunocontéudo do BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal 60 min após a administração de ZnCl ₂	123

CAPÍTULO II

Figura II.1. Diagrama do protocolo experimental.....	134
Figura II.2. Influência da inibição da HO-1 nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	137
Figura II.3. Influência da indução da HO-1 nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	139
Figura II.4. Influência do receptor TrkB nos efeitos do ZnCl ₂ no TSC e TCA.....	141
Figura II.5. Efeito do tratamento com ZnCl ₂ no imunocontéudo da HO-1 no córtex pré-frontal e hipocampo.....	143

CAPÍTULO III

Figura III.1. Diagrama do protocolo experimental.....	151
Figura III.2. Efeito do tratamento com ZnCl ₂ ou fluoxetina no protocolo de estresse crônico imprevisível.....	155
Figura III.3. Efeito repetido do tratamento com ZnCl ₂ ou fluoxetina no imunocontéudo de GFAP no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível.....	156
Figura III.4. Efeito repetido do tratamento com ZnCl ₂ ou fluoxetina no imunocontéudo de GLT-1 e EAAC-1 no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível.....	158
Figura III.5. Efeito repetido do tratamento com ZnCl ₂ ou fluoxetina na relação p-Akt/t-Akt e no imunocontéudo da t-Akt e p-Akt no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível.....	160
Figura III.6. Avaliação da viabilidade celular em fatiais hipocampais expostas ao glutamato de camundongos previamente tratados com ZnCl ₂ ou fluoxetina e submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível.....	162

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO / CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tabela 1. Critérios de diagnóstico do transtorno depressivo maior de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5).....	25
Tabela 2. Localização dos EAATs	42
Tabela 3. Estudos clínicos relacionando zinco e depressão	87
Tabela 4. Estudos pré-clínicos relacionando zinco e depressão	93

CAPÍTULO III

Tabela III.1. Protocolo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo do estresse crônico imprevisível	150
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
Akt	proteína cinase B
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato
AMPC	3,5'-monofosfato de adenosina cíclico
ARE	elemento de resposta a antioxidante
BDNF	fator neurotrófico derivado do encéfalo
CAMKII	proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina
CoPP	protoporfirina de cobalto
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
DMSO	dimetil sulfóxido
DO	densidade óptica
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais 5 ^a
edição	
EAAT	transportadores de aminoácidos excitatórios
E.P.M.	erro padrão da média
ERK	proteína cinase regulada por sinal extracelular
GABA	ácido gama aminobutírico
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
GSK-3β	glicogênio sintase cinase 3 β
HO	heme oxigenase
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
IC	intervalo de confiança
i.c.v.	intracerebroventricular
KCC2	cotransportador de potássio e cloreto
Keap1	<i>kelch-like-ECH-associated protein 1</i>
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno
MAO	monoamina oxidase
MEK	ERK cinase
mTOR	proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-difeniltetrazolium brometo
NFκB	fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1
Nrf2	fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
OR	<i>odds ratio</i>
PI3K	fosfatidilinositol 3 cinase
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C

PLC	fosfolipase C
p.o.	<i>per os</i>
Raf	proteína associada ao Ras
Ras	proteína de ligação ao GTP
SNC	sistema nervoso central
SRE	elemento de resposta sérica
SOD	superóxido dismutase
TCA	teste do campo aberto
TNF	teste do nado forçado
TrkB	receptor tropomiosina cinase B
TSC	teste de suspensão pela cauda
Zip	proteínas de importação do zinco
ZnCl₂	cloreto de zinco
ZnPP	protoporfirina de zinco
ZnT	transportadores de zinco

LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS:

1. **MANOSSO, LUANA M.**; MORETTI, MORGANA; COLLA, ANDRÉ R.; RIBEIRO, CAMILLE M.; DAL-CIM, Tharine; TASCA, Carla I.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Involvement of glutamatergic neurotransmission in the antidepressant-like effect of zinc in the chronic unpredictable stress model of depression. *Journal of Neural Transmission*, v. 123, n. 3, p.339-352, 2016.
2. **MANOSSO, LUANA M.**; MORETTI, MORGANA; RIBEIRO, CAMILLE M.; GONÇALVES, FILIPE M.; LEAL, RODRIGO B.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Antidepressant-like effect of zinc is dependent on signaling pathways implicated in BDNF modulation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 59, p. 59-67, 2015.
3. NEIS, VIVIAN BINDER; **MANOSSO, Luana M.**; MORETTI, MORGANA; FREITAS, ANDIARA E.; DAUFENBACH, JULIANA; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α is abolished by agmatine administration. *Behavioural Brain Research*, v. 261, p. 336-344, 2014.
4. COLLA, ANDRÉ R.S.; OLIVEIRA, ÁGATHA; PAZINI, FRANCIS L.; ROSA, JULIA M.; **MANOSSO, LUANA M.**; CUNHA, MAURICIO P.; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 124, p. 108-116, 2014.
5. **MANOSSO, LUANA M.**; MORETTI, MORGANA ; RODRIGUES, ANA LÚCIA S. Nutritional strategies for dealing with depression. *Food & Function*, v. 4, p. 1776-1793, 2013.
6. WAZLAWIK, Elisabeth; SILVA, A.F.; **MANOSSO, LUANA M.**; GAZZOLA, Jussara; BATISTA, S.M.M. Atividades educativas relacionadas ao tratamento dietético em portadores de diabetes mellitus internados no HU-UFSC. *Extensio (Florianópolis)*, v. 11, p. 172-178, 2014.

LIVRO PUBLICADO:

1. Moritz, Bettina; **MANOSSO, LUANA M.** Nutrição Clínica Funcional - Neurologia. 1. ed. São Paulo: Valéria Paschoal Editora Ltda, 2013. 240p .

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS:

1. MORETTI, M.; **Manosso, LUANA M**; Rodrigues, Ana Lúcia Severo. Vitamins and Minerals as Alternative or Complementary Therapies in Depression. In: Alexandra M. Columbus. (Org.). Advances in Psychology Research. 1ed.New York: Nova Science Publishers, 2015, v. 107, p. 0-

2. **MANOSSO, LUANA M.** Funcionamento do sistema nervoso central. In: Bettina Moritz; Luana Meller Manosso. (Org.). Nutrição Clínica Funcional - Neurologia. 1ed.São Paulo: Valéria Paschoal Editora Ltda, 2013, v. , p. 10-34.

3. **MANOSSO, LUANA M.;** Moritz, Bettina. Neuroendocrinologia do estresse. In: Bettina Moritz; Luana Meller Manosso. (Org.). Nutrição Clínica Funcional - Neurologia. 1ed.São Paulo: Valéria Paschoal Editora Ltda, 2013, v. , p. 36-50.

4. **MANOSSO, LUANA M.** Enxaqueca. In: Bettina Moritz; Luana Meller Manosso. (Org.). Nutrição Clínica Funcional - Neurologia. 1ed.São Paulo: Valéria Paschoal Editora Ltda, 2013, v. , p. 72-92.

5. **MANOSSO, LUANA M.;** Moritz, Bettina. Depressão. In: Bettina Moritz; Luana Meller Manosso. (Org.). Nutrição Clínica Funcional - Neurologia. 1ed.São Paulo: Valéria Paschoal Editora Ltda, 2013, v. , p. 109-165.

6. MORETTI, Morgana; Moritz, Bettina; **MANOSSO, LUANA M.** Transtornos de Ansiedade. In: Bettina Moritz; Luana Meller Manosso. (Org.). Nutrição Clínica Funcional - Neurologia. 1ed.São Paulo: Valéria Paschoal Editora Ltda, 2013, v. , p. 93-107.

7. MORETTI, Morgana; Moritz, Bettina; **MANOSSO, LUANA M.** Transtorno bipolar. In: Bettina Moritz; Luana Meller Manosso. (Org.). Nutrição Clínica Funcional - Neurologia. 1ed.São Paulo: Valéria Paschoal Editora Ltda, 2013, v. , p. 166-180.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	TRANSTORNOS DEPRESSIVOS	23
1.1.1	Hipótese monoaminérgica.....	27
1.1.2	Hipótese neurotrófica	31
1.1.3	Neurotransmissão glutamatérgica e depressão	38
1.1.4	Função astrocitária, GFAP e depressão	47
1.1.5	Estresse e depressão.....	49
1.1.6	Vias de sinalização intracelular envolvidas na depressão.....	58
1.2	MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO.....	67
1.3	ZINCO	69
1.3.1	Absorção e metabolismo do zinco.....	71
1.3.2	Zinco no SNC	74
1.3.3	Zinco e depressão.....	84
2	JUSTIFICATIVA	97
3	OBJETIVOS	99
3.1	OBJETIVO GERAL	99
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	99
4	RESULTADOS	101

CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO BDNF NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ZINCO..... 103

1	MATERIAIS E MÉTODOS	104
1.1	ANIMAIS	104
1.2	COMPOSTOS E TRATAMENTOS	104
1.3	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	106
1.3.1	Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	106
1.3.2	Teste do campo aberto (TCA).....	106
1.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	107
1.4.1	Preparação do tecido.....	107
1.4.2	Western blotting	108
1.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	109
2	RESULTADOS	109
2.1	OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS	109
2.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	122
3	DISCUSSÃO	124
4	CONCLUSÃO	129

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO PAPEL DA HO-1 NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ZINCO	131
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	132
1.1 ANIMAIS	132
1.2 COMPOSTOS E TRATAMENTOS.....	132
1.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	134
1.3.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	134
1.3.2 Teste do campo aberto (TCA).....	134
1.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	134
1.4.1 Preparação do tecido	134
1.4.2 Western blotting.....	135
1.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	135
2 RESULTADOS.....	136
2.1 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS	136
2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	142
3 DISCUSSÃO.....	144
4 CONCLUSÃO	146

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ZINCO NO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL	147
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	148
1.1 ANIMAIS	148
1.2 COMPOSTOS E TRATAMENTOS.....	148
1.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	149
1.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	150
1.4.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	151
1.4.2 Teste do campo aberto (TCA).....	151
1.5 TOXICIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO.....	151
1.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	152
1.6.1 Preparação do tecido	152
1.6.2 Western blotting.....	152
1.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	153
2 RESULTADOS.....	153
2.1 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS	153
2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	156
2.3 TOXICIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO.....	161
3 DISCUSSÃO.....	162
4 CONCLUSÃO	169

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	171
6	CONCLUSÃO	179
7	PERSPECTIVAS	181
	REFERÊNCIAS	183
	APÊNDICES.....	235
	APÊNDICE A - ESTUDOS CLÍNICOS RELACIONANDO ZINCO E DEPRESSÃO.....	235
	APÊNDICE B - ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS RELACIONANDO ZINCO E DEPRESSÃO.....	241
	ANEXOS	253
	ANEXO A – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.....	253

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNOS DEPRESSIVOS

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5), os transtornos depressivos incluem: (a) transtorno disruptivo da desregulação do humor; (b) transtorno depressivo maior; (c) transtorno depressivo persistente (distímia); (d) transtorno disfórico pré-menstrual; (e) transtorno depressivo induzido por substância/medicação; (f) transtorno depressivo devido a outra condição médica; (g) transtorno depressivo específico; (h) transtorno depressivo inespecífico (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013). O foco deste trabalho é no transtorno depressivo maior, que a partir de agora será chamado de depressão.

A depressão é considerada uma doença crônica, recorrente, debilitante e ameaçadora de vida. Estima-se que a prevalência mundial desse transtorno mental varie de 14-17% e que o número de indivíduos que desenvolvem episódios recorrentes de depressão seja maior do que aqueles que desenvolvem apenas um episódio ao longo da vida (10,3% e 4,1% respectivamente) (KESSLER *et al.*, 2005; KESSLER *et al.*, 2012; HILLHOUSE e PORTER, 2015). A depressão é mais prevalente na idade adulta (18 – 64 anos) do que na adolescência ou nos adultos idosos (a partir de 65 anos), com uma idade média de início por volta dos 20-30 anos (KESSLER *et al.*, 2003; KESSLER *et al.*, 2005; KESSLER *et al.*, 2012). Além disso, esse transtorno de humor é de duas a três vezes mais prevalente em mulheres do que em homens (KESSLER *et al.*, 2012).

Em relação à prevalência da depressão no Brasil, após realizar uma revisão sistemática e meta-análise, Silva e colaboradores (2014) demonstraram que a prevalência de sintomas depressivos foi de 14% e que a prevalência de transtorno depressivo (considerando o período de 1 ano) foi de 8%. Similar ao encontrado no resto do mundo, a prevalência de depressão ao longo da vida aqui no Brasil também foi de aproximadamente 17% (SILVA *et al.*, 2014). Por outro lado, um trabalho recente realizado com a população brasileira acima de 18 anos demonstrou que a prevalência de depressão no Brasil é de 4,1%, o que corresponde a aproximadamente 5,5 milhões de pessoas afetadas por esse transtorno. Além disso, a depressão foi mais prevalente em indivíduos com 40-59 anos ou acima de 80 anos, em mulheres (duas vezes maior do que em homens), em indivíduos morando na área urbana (50% maior do que indivíduos morando na área rural) e em pessoas com menor nível educacional. Vale destacar que a região Sul foi a região do

Brasil com maior prevalência de depressão (4,8%) e que pessoas fumantes, com hipertensão arterial, diabetes mellitus ou doenças do coração tem maior prevalência desse transtorno de humor (6,1%, 7,5%, 8,6% e 14% respectivamente) (MUNHOZ *et al.*, 2016).

A depressão ocasiona impactos sociais, familiares, pessoais e econômicos, além de piorar a qualidade de vida do indivíduo afetado (NEMEROFF, 2007; LEPINE e BRILEY, 2011). Esse transtorno de humor também está associado com diversas comorbidades, incluindo outras doenças mentais (ex: transtorno de ansiedade, transtornos psicóticos e abuso de drogas) e doenças crônicas (ex: diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão arterial) (KESSLER *et al.*, 2003; BROWN, VARGHESE e MCEWEN, 2004; KATON, LIN e KROENKE, 2007; THAIPISUTTİKUL *et al.*, 2014). Em um recente trabalho avaliando os *odds ratio* (OR) de várias comorbidades foi demonstrado que várias patologias são mais prevalentes em indivíduos com depressão, incluindo asma (OR=1,53, 95% intervalo de confiança (IC), 1,03–2,28), artrite (OR=1,95, 95% IC, 1,17–3,25), gota (OR=2,65, 95% IC, 1,39–5,04), ataque cardíaco (OR=3,76, 95% IC, 1,95–7,27), acidente vascular encefálico (OR=2,83, 95% IC, 1,59–5,06), diabetes mellitus (OR=1,65, 95% IC, 0,93–2,92) e problemas tireoidianos (OR=1,96, 95% IC, 1,21–3,29) (KIM, SHIN e SONG, 2015). Uma meta-análise também revelou que pacientes com depressão têm um risco aumentado de mortalidade por todas as causas e mortalidade por suicídio quando comparado com indivíduos sem depressão, reforçando a ideia de que esse transtorno de humor seja um problema de saúde pública (CHESNEY, GOODWIN e FAZEL, 2014). Vale destacar que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, a depressão era a terceira causa de incapacitação mundial em 2004 (ficando atrás de infecções respiratórias e doenças diarreicas) e que a estimativa para o ano de 2030 é que a depressão passe a ser a principal causa de incapacitação do mundo. É interessante observar que levando em consideração apenas os países da América, Europa e Oceano Pacífico, a depressão já era a principal causa de incapacitação em 2004 (WHO, 2008).

De acordo com o DSM-5 da Associação Americana de Psiquiatria (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013) para o indivíduo ser diagnosticado com depressão ele deve apresentar pelo menos cinco dos sintomas apresentado na **Tabela 1** por um período de no mínimo duas semanas. Além disso, pelo menos um desses cinco sintomas deve ser, obrigatoriamente, o humor deprimido ou a anedonia, que é caracterizada como uma diminuição de interesse/prazer por todas ou quase todas as atividades diárias. Os outros sintomas que o indivíduo

pode apresentar são: alteração no peso ou apetite (mudança de mais de 5% em um mês, sem fazer dieta), alteração no sono, alteração na atividade psicomotora, falta de energia ou fadiga, sentimento de inutilidade, diminuição na capacidade de se concentrar ou de pensar e ideação suicida. Vale destacar que, para o indivíduo ser classificado com transtorno depressivo maior, os sintomas listados acima, com exceção do ganho/perda de peso e da ideação suicida, devem estar presentes todos os dias, por um período mínimo de duas semanas. Além disso, os episódios depressivos devem comprometer significativamente o funcionamento social ou ocupacional e não devem ser atribuídos ao abuso de substâncias ou a outros distúrbios psicológicos, como a esquizofrenia e transtorno bipolar (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

Tabela 1. Critérios de diagnóstico do transtorno depressivo maior de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5)

-
1. Humor deprimido
 2. Anedonia
-
3. Perda de peso e apetite / ganho de peso ou apetite
 4. Insônia / hipersônia
 5. Agitação psicomotora / letargia
 6. Fadiga ou falta de energia
 7. Falta de esperança, desespero, sentimento de culpa ou desvalia
 8. Dificuldade de concentração ou indecisão
 9. Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio
-

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais 5ª edição (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

Levando em consideração o impacto da depressão, esforços têm sido feitos na busca do melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos, das estruturas encefálicas envolvidas e de melhores estratégias de tratamento para esse transtorno de humor. Estudos pós-morte ou estudos de neuroimagem têm identificado estruturas cerebrais que são importantes para a regulação do humor e que estão envolvidas na depressão, incluindo o córtex pré-frontal, córtex cingulado, núcleo accumbens, gânglios da base, amígdala, hipocampo, estriado e tálamo (DREVETS, PRICE e FUREY, 2008; KRISHNAN e NESTLER, 2008; SAVITZ e DREVETS, 2009; RUSSO e NESTLER, 2013). Dentre essas estruturas, destaca-se o hipocampo e o córtex pré-frontal.

O hipocampo está envolvido com aprendizado e consolidação da memória e diversos estudos de revisão denotam o papel do hipocampo na fisiopatologia da depressão, já que essa região encefálica também está envolvida na regulação do humor, emoção e suscetibilidade ao estresse crônico (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; FUCHS *et al.*, 2004; SHELINE, 2011). Em uma meta-análise, após avaliar o volume hipocampal de 393 pacientes com depressão e 303 sujeitos controle (de 12 estudos diferentes), foi demonstrado um menor volume hipocampal nos pacientes com depressão (CAMPBELL *et al.*, 2004). Mais recentemente, outro estudo sugeriu que a diminuição do volume hipocampal poderia ser um marcador para depressão ou um marcador de vulnerabilidade para episódios futuros, enquanto que um volume hipocampal maior poderia ser um marcador de resiliência à depressão (CHAN *et al.*, 2016). Entretanto, os autores frisam a necessidade de mais estudos para o melhor entendimento do papel do volume hipocampal e sua associação com vulnerabilidade e resiliência à depressão. Por outro lado, o tratamento por oito semanas com antidepressivo, reverteu a diminuição do volume da matéria cinzenta em pacientes com depressão, voltando ao nível do controle (ARNONE *et al.*, 2013). Embora essa diminuição no volume hipocampal esteja bem elucidada, ainda é questionável se essa diminuição é uma causa ou uma consequência da depressão (SHELINE, 2011).

Estudos de neuroimagem ou pós-morte também demonstram o envolvimento do córtex pré-frontal na fisiopatologia da depressão (DREVETS, 2001; KRISHNAN e NESTLER, 2008). O córtex pré-frontal tem um papel importante no controle cognitivo, na capacidade de orquestrar pensamento e ação, bem como no controle do sistema de recompensa e experiência hedônica (MILLER e COHEN, 2001; KRINGELBACH, 2005). Estudos demonstram que pacientes com depressão tinham uma diminuição na função do córtex pré-frontal (HASLER *et al.*, 2004), além de uma diminuição do metabolismo da glicose e do fluxo sanguíneo nessa região encefálica (DREVETS, PRICE e FUREY, 2008). Uma diminuição no volume da matéria cinzenta do córtex pré-frontal também já foi relatada em indivíduos com depressão (SHELINE, 2003). Essas alterações no córtex pré-frontal estão associadas, principalmente, com a diminuição na resposta hedônica e responsividade exagerada ao estresse dos indivíduos acometidos por esse transtorno de humor (GEORGE, KETTER e POST, 1994; DREVETS, 2001; HASLER *et al.*, 2004).

Em relação aos fatores causais da depressão, sabe-se que fatores genéticos e ambientais podem interagir entre si e criar um ambiente no

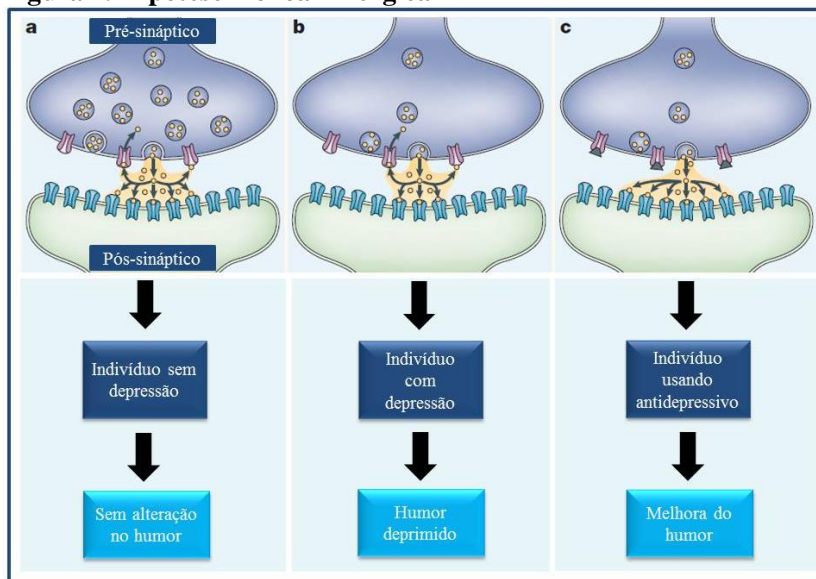
qual os indivíduos estejam mais predispostos a desenvolver esse transtorno de humor (RAISON, CAPURON e MILLER, 2006; FLINT e KENDLER, 2014). Entretanto, ainda não existe um completo entendimento de todos os mecanismos envolvidos na etiologia e fisiopatologia da depressão. A primeira hipótese que surgiu para explicar a depressão foi a hipótese monoaminérgica, que postula que a depressão ocorra devido uma diminuição de neurotransmissores monoaminérgicos, que incluem a serotonina, norepinefrina e dopamina (SCHILDKRAUT, 1965; DELGADO, 2000). Embora essa hipótese ainda seja válida, outras hipóteses envolvendo neurotransmissores, hormônios e mediadores inflamatórios sugerem um papel relevante na fisiopatologia da depressão, entre elas: hipótese neurotrófica (DUMAN, 2004b; DUMAN e MONTEGGIA, 2006; HAASE e BROWN, 2015), estresse e desregulação no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (PARIANTE e LIGHTMAN, 2008; SIEGRIST *et al.*, 2012; DURIC e DUMAN, 2013), excesso de glutamato (SANACORA *et al.*, 2008; GHASEMI *et al.*, 2009; HILLHOUSE e PORTER, 2015; DEUTSCHENBAUR *et al.*, 2016), aumento da inflamação (SMITH, PECK e WARD, 1990; MAES, 2008; MILLER, MALETIC e RAISON, 2009; LEONARD, 2014) e do estresse oxidativo (SARANDOL *et al.*, 2007; BEHR, MOREIRA e FREY, 2012; LIU *et al.*, 2015), alteração em vias de sinalização intracelular (DUMAN *et al.*, 2012; MARSDEN, 2013), entre outros. A seguir, será explanado sobre alguns pontos relevantes sobre a fisiopatologia e tratamento da depressão que estão correlacionados com o presente trabalho.

1.1.1 Hipótese monoaminérgica

A hipótese monoaminérgica surgiu em meados de 1960 e postula que a depressão ocorre devido a uma diminuição dos neurotransmissores monoaminérgicos na fenda sináptica (SCHILDKRAUT, 1965). Esta hipótese surgiu a partir de observações clínicas que demonstraram: a) a presença de sintomas depressivos em pacientes que utilizaram o anti-hipertensivo reserpina (que também leva a uma diminuição das monoaminas por impedir o transporte vesicular desses neurotransmissores) (FREIS, 1954); b) uma melhora no humor de pacientes com tuberculose tratados com iproniazida (que é um inibidor não seletivo da enzima que degrada as monoaminas - monoamina oxidase (MAO)) (DELAY, LAINE e BUISSON, 1952); c) a melhora de sintomas depressivos após a utilização do anti-histamínico imipramina (que também inibe a recaptação da serotonina, norepinefrina e dopamina) (KRAKOWSKI, 1962).

Desde o surgimento da hipótese monoaminérgica até os dias de hoje diversos estudos (pré-clínicos e clínicos) e revisões já foram realizados reforçando a importância do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão (MANN *et al.*, 2000; BLIER e EL MANSARI, 2013; SACHS *et al.*, 2013). Como esquematizado de maneira simplificada na **Figura 1**, no encéfalo de um indivíduo sem depressão, os neurotransmissores monoaminérgicos são liberados de neurônios pré-sinápticos para a fenda sináptica, podendo se ligar em receptores presentes em neurônios pós-sinápticos. A seguir, as monoaminas são eliminadas da fenda sináptica por degradação enzimática ou por recaptação para o neurônio pré-sináptico. Já em indivíduos depressivos, ocorre uma diminuição na quantidade de monoaminas na fenda sináptica ou um prejuízo na funcionalidade dos receptores monoaminérgicos, o que propicia o aparecimento de sintomas depressivos. Por outro lado, após o tratamento com antidepressivos, que atuam normalizando os níveis de monoaminas na fenda sináptica, ocorre uma remissão dos sintomas depressivos (CASTREN, 2005).

Figura 1. Hipótese monoaminérgica



Legenda: a) No encéfalo de um indivíduo normal, as monoaminas (representadas em círculos amarelos) são liberadas para a fenda sináptica e se ligam em receptores (em azul) no neurônio pós-sináptico. Após exercerem suas ações, as monoaminas são recaptadas para o neurônio pré-sináptico através de transportadores específicos (em roxo); b) No encéfalo de um indivíduo com depressão, ocorre uma diminuição na quantidade de monoaminas na fenda sináptica, propiciando o aparecimento do humor deprimido; c) Após a utilização de antidepressivos (triângulos em cinza) que bloqueiam a recaptação das monoaminas, ocorre um reestabelecimento da quantidade de monoaminas na fenda sináptica e posterior melhora do humor. Fonte: adaptado de Castren (2005).

A maior parte dos medicamentos utilizados na clínica para tratar a depressão reforça a hipótese monoaminérgica. Como recentemente revisado (HILLHOUSE e PORTER, 2015), a primeira linha de escolha para tratar pacientes com depressão continua sendo fármacos que influenciam na neurotransmissão monoaminérgica. Esses fármacos incluem os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ex: fluoxetina), inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina (ex: venlafaxina – também classificada como antidepressivo atípico),

inibidores da recaptação de norepinefrina e dopamina (ex: bupropiona – também classificada como antidepressivo atípico), antidepressivos tricíclicos, que inibem a recaptação de serotonina, norepinefrina e dopamina (ex: imipramina) e inibidores da enzima MAO (ex: iproniazida).

Apesar dessa hipótese ainda ser aceita para explicar, pelo menos em parte, para explicar a fisiopatologia da depressão, essa hipótese, bem como o tratamento com antidepressivos que agem aumentando as monoaminas na fenda sináptica possuem algumas limitações. Em primeiro lugar, estima-se que cerca de 50% a 60% nos pacientes não respondem de maneira adequada ao tratamento com esses antidepressivos clássicos, o que se chama de depressão resistente ao tratamento (FAVA, 2003). Várias meta-análises que avaliaram a eficácia dos antidepressivos demonstraram que a efetividade desses fármacos variam de acordo com o tipo de fármaco e com a severidade da doença, mas que existe um grande número de respostas parciais ou não respostas (KIRSCH *et al.*, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009; NAUDET, MARIA e FALISSARD, 2011; VOHRINGER e GHAEMI, 2011). Todavia, mesmo em pacientes que respondem ao tratamento, ocorre uma demora de 3 até 12 semanas para a remissão dos sintomas, embora as monoaminas aumentem logo após o início do tratamento (NEMEROFF e OWENS, 2002; UHER *et al.*, 2011). Além disso, mesmo em pacientes que respondem ao tratamento, melhorando os sintomas da depressão, raramente ocorre uma remissão total de todos os sintomas, sendo comum continuar com prejuízo cognitivo ou disfunção social, reduzindo o desempenho e qualidade de vida do paciente e aumentando a recorrência (LEPINE e BRILEY, 2011). Em um estudo de coorte prospectivo com 387 pacientes, com duração de 34,5 meses, foi evidenciado que 76,5% dos pacientes apresentaram depressão recorrente (PESELOW *et al.*, 2015). Ademais, o tratamento farmacológico clássico da depressão também possui efeitos colaterais (como dores de cabeça, boca seca, obstipação intestinal, disfunção sexual, ganho de peso, entre outros), o que pode prejudicar a adesão do paciente ao tratamento (SERRETTI e MANDELLI, 2010; BET *et al.*, 2013).

Vale destacar que alguns dados da literatura contradizem a hipótese monoaminérgica, demonstrando que a depleção de monoaminas em indivíduos saudáveis não desencadeia sintomas depressivos (SALOMON *et al.*, 1997). Por outro lado, o efeito da depleção de monoaminas em pacientes com depressão ainda é questionável. Sugere-se que a depleção desses neurotransmissores não induza sintomas imediatos de depressão, mas que pode propiciar

sintomas transitórios em alguns pacientes (BOOIJ, VAN DER DOES e RIEDEL, 2003). Além disso, algumas drogas de abuso (como a cocaína e a anfetamina) que aumentam a neurotransmissão monoaminérgica não são efetivas para tratar a depressão (HINDMARCH, 2001).

Com base no exposto, percebeu-se que, além de um aumento nos níveis de monoaminas, outras alterações cerebrais também são necessárias para uma melhora dos sintomas depressivos. Dentre essas alterações envolvidas na fisiopatologia e no tratamento da depressão, destaca-se o papel da neuroplasticidade, neurogênese e dos fatores neurotróficos (DUMAN e LI, 2012).

1.1.2 Hipótese neurotrófica

Devido às limitações da hipótese monoaminérgica, bem como do tratamento com antidepressivos baseado no aumento das monoaminas na fenda sináptica, as pesquisas na área da depressão deixaram de investigar apenas o papel das monoaminas e passaram a averiguar o papel putativo dos fatores de crescimento como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que está criticamente envolvido na regulação da estrutura neuronal e na plasticidade do encéfalo adulto (THOENEN, 1995; NESTLER *et al.*, 2002). Assim, surgiu a hipótese neurotrófica, que postula que a diminuição do BDNF exerça um papel importante na fisiopatologia da depressão e que, o reestabelecimento dos níveis dessa neurotrofina está envolvido na efetividade dos antidepressivos (ALME *et al.*, 2007; GROVES, 2007; LINDHOLM e CASTREN, 2014).

Estudos demonstram que a depressão está associada com mudanças estruturais e celulares no hipocampo, com uma diminuição no volume hipocampal em torno de 10-15% (CAMPBELL e MACQUEEN, 2004; VIDEBECH e RAVNKILDE, 2004). Acredita-se que essa diminuição do volume hipocampal possa ser decorrência de uma diminuição da neurogênese, aumento na morte de neurônios e/ou retração de dendritos (CZEH e LUCASSEN, 2007). Vale destacar que essas alterações podem ser influenciadas por uma série de fatores neurotróficos, entre eles, o BDNF (HAASE e BROWN, 2015). Uma das principais funções do BDNF é o seu papel na plasticidade sináptica, sendo crucial para processos de aprendizagem e memória, além de ser importante para o desenvolvimento e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos e GABAérgicos (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; AUTRY e MONTEGGIA, 2012). O BDNF também é importante para a sobrevivência e manutenção dos dendritos dos neurônios (GORSKI *et al.*, 2003), que é confirmada pela

retração dos dendritos quando ocorre uma diminuição da expressão do receptor do BDNF (receptor tropomiosina cinase B - TrkB) (SCHECTERSON *et al.*, 2012).

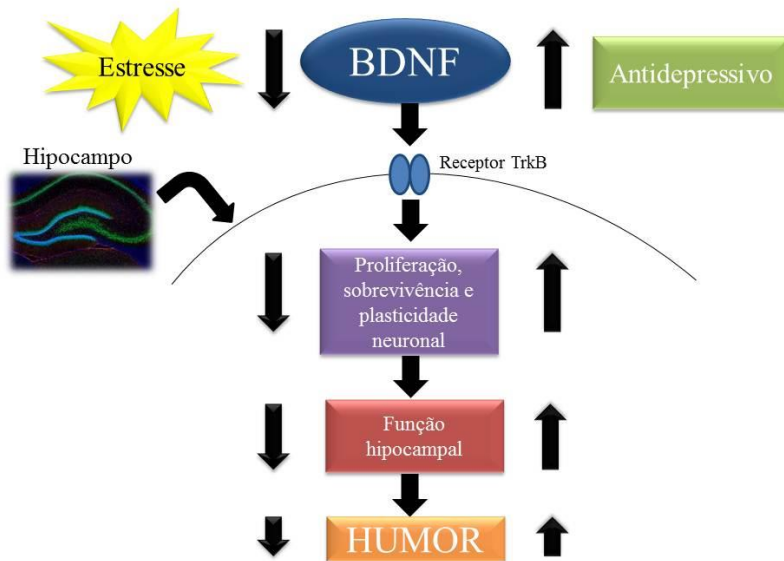
Em humanos com depressão já foi demonstrado uma diminuição dos níveis séricos e plasmáticos de BDNF (KAREGE *et al.*, 2005a; LEE *et al.*, 2007; SEN, DUMAN e SANACORA, 2008). Além disso, estudos pós-morte em pacientes que tinham depressão ou em vítimas de suicídio também revelaram uma diminuição no RNAm do BDNF no hipocampo (DWIVEDI *et al.*, 2003; KAREGE *et al.*, 2005b) e no córtex pré-frontal (DWIVEDI *et al.*, 2003; KAREGE *et al.*, 2005b; PANDEY *et al.*, 2008; RAY, SHANNON WEICKERT e WEBSTER, 2014). Outros estudos pós-morte com indivíduos com depressão também evidenciaram uma diminuição nos níveis de RNAm do receptor TrkB no hipocampo (THOMPSON RAY *et al.*, 2011) e no córtex pré-frontal (DWIVEDI *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2008). Em indivíduos que cometeram suicídio também foi demonstrado uma diminuição nos níveis de RNAm do receptor TrkB no hipocampo (DWIVEDI *et al.*, 2003). Além disso, após avaliar vários estudos, uma meta-análise também demonstrou que no polimorfismo no gene do BDNF (Val66Met), o alelo Met está relacionado com uma menor secreção de BDNF, pode aumentar o risco de desenvolver depressão, principalmente em indivíduos com eventos estressantes durante a vida (HOSANG *et al.*, 2014). Entretanto, ainda existem estudos contraditórios, não demonstrando associação entre polimorfismo no gene do BDNF e depressão, como sugerido por meta-análise realizada por Chen e colaboradores (2008).

Em estudos pré-clínicos, utilizando modelos animais de depressão induzida por estresse observa-se uma diminuição dos níveis de BDNF em algumas regiões encefálicas, principalmente no hipocampo (MURAKAMI *et al.*, 2005; GRONLI *et al.*, 2006). Por outro lado, em animais deficientes de BDNF ocorre um aumento na sensibilidade ao estresse, além de um comportamento tipo-depressivo após os animais serem expostos a um protocolo de estresse moderado (ADVANI, KOEK e HENSLER, 2009). Corroborando a importância do BDNF na depressão, diversos estudos e meta-análise demonstram que, tanto em animais, quanto em humanos, o tratamento crônico com antidepressivos é capaz de aumentar os níveis hipocampais, no córtex pré-frontal ou séricos de BDNF (CHEN *et al.*, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2003; BALU *et al.*, 2008; SEN, DUMAN e SANACORA, 2008). Além disso, já foi denotado que um prejuízo na sinalização do BDNF (ex: deleção do receptor TrkB) prejudica a ação de antidepressivos, pelo menos em camundongos (LI *et al.*, 2008). Por outro lado, um aumento

na sinalização do BDNF (ex: aumento na expressão do BDNF ou do receptor TrkB) resulta em efeitos tipo-antidepressivos (KOPONEN *et al.*, 2005; TALIAZ *et al.*, 2011). É interessante ressaltar que a administração de BDNF periféricamente (SCHMIDT e DUMAN, 2010) ou centralmente (via intracerebroventricular ou diretamente no hipocampo) (SHIRAYAMA *et al.*, 2002; HOSHAW, MALBERG e LUCKI, 2005) também resulta em efeitos tipo-antidepressivos.

Dessa forma, a hipótese neurotrófica postula que a depressão resulta de uma diminuição nos fatores neurotróficos, levando à atrofia neuronal, perda de células gliais e diminuição da neurogênese hipocampal (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; DUMAN e LI, 2012). Como esquematizado na **Figura 2**, diversas situações, como o estresse intenso ou crônico, podem culminar com uma diminuição nos níveis de BDNF. A diminuição da sinalização do BDNF no hipocampo propicia uma diminuição na proliferação, sobrevivência e plasticidade neuronal, que desencadeia uma diminuição na função hipocampal, culminando com o aparecimento de sintomas depressivos. Por outro lado, o tratamento com antidepressivo aumenta os níveis de BDNF, revertendo essas alterações hipocampais e, desse modo, retomando a função hipocampal e o reestabelecimento do humor (GROVES, 2007).

Figura 2. Modelo simplificado do papel do estresse e da terapia com antidepressivos na expressão do BDNF, função hipocampal e humor



Legenda: O estresse diminui os níveis de BDNF. A diminuição da ligação dessa neurotrofina em seus receptores TrkB no hipocampo causa uma diminuição da proliferação, sobrevivência e plasticidade neuronal, que por sua vez diminui a função hipocampal, contribuindo para a diminuição do humor. Por outro lado, a utilização crônica de antidepressivos propicia um aumento nos níveis do BDNF, aumentando sua sinalização no hipocampo e, por consequência, melhorando o humor. Abreviaturas: BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; TrkB, receptor tropomiosina cinase B. Fonte: adaptado de Groves (2007).

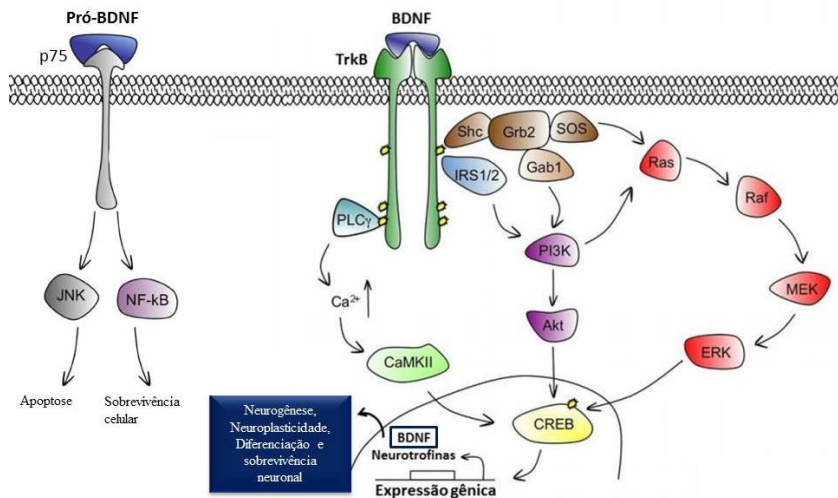
O BDNF é sintetizado como uma proteína precursora chamada pré-pró-BDNF, que depois é clivada formando o pró-BDNF (ainda no retículo endoplasmático rugoso). O pró-BDNF (35 kDa) vai para o aparelho de Golgi, onde pode ser clivado formando o BDNF maduro (14 kDa) (LESSMANN, GOTTMANN e MALCANGIO, 2003). O pró-BDNF pode ser clivado intracelularmente por enzimas tipo furinas (presentes no aparelho de Golgi) ou pró-convertases (presentes nos grânulos secretórios). Outra opção é o pró-BDNF ser secretado dessa

forma (como pró-BDNF) e então, ser clivado por proteases extracelulares, tais como metaloproteínases de matriz e plasmina, formando o BDNF maduro (LESSMANN, GOTTMANN e MALCANGIO, 2003; GREENBERG *et al.*, 2009; CUNHA, BRAMBILLA e THOMAS, 2010). Nos tecidos, a plasmina está presente na forma inativa, plasminogênio. Quando o pró-BDNF é liberado, ocorre a liberação conjunta da enzima do ativador do plasminogênio tecidual, que é a enzima que converterá o plasminogênio em plasmina, podendo, assim, ativar o BDNF (WATERHOUSE e XU, 2009).

Vale destacar que o pró-BDNF não é um precursor inativo, possuindo efeitos no SNC independente do BDNF maduro (AUTRY e MONTEGGIA, 2012). Digno de nota, um recente estudo de revisão demonstrou a importância de avaliar tanto o pró-BDNF quanto o BDNF maduro nos transtornos de humor (YEH, KAO e KUO, 2015). O pró-BDNF e o BDNF maduro ativam vias de sinalização intracelular diferentes. O pró-BDNF se liga em um receptor de neurotrofina de baixa afinidade chamado de p75 (ou p75^{NTR}). A ativação do receptor p75 pode exercer funções duais, podendo ativar vias apoptóticas ou de sobrevivência celular. O BDNF maduro, por sua vez, se liga no receptor de alta afinidade chamado TrkB, que pode ativar várias vias de sinalização que culminam com um aumento na transcrição do próprio BDNF (HEMPSTEAD, 2002; CHAO, 2003; LESSMANN, GOTTMANN e MALCANGIO, 2003; AUTRY e MONTEGGIA, 2012). Quando o BDNF maduro se liga ao seu receptor TrkB, ocorre a dimerização e autofosforilação em resíduos de tirosina. Isso faz com que esse receptor que possui atividade tirosina cinase adquira a capacidade de fosforilar outros substratos em resíduos de tirosina, desencadeando uma cascata de fosforilação intracelular que culmina em uma resposta específica (MALBERG, 2004; AUTRY e MONTEGGIA, 2012). Como demonstrado na **Figura 3**, as principais vias ativadas pelo TrkB são as vias da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK ou proteína cinase regulada por sinal extracelular - ERK), fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) e proteína cinase B (Akt), bem como a via da fosfolipase C (PLC) e proteína cinase dependente de Ca²⁺/calmodulina (CAMKII) (REICHARDT, 2006; CHEN *et al.*, 2007; CUNHA, BRAMBILLA e THOMAS, 2010; NUMAKAWA *et al.*, 2010). Essas vias de sinalização convergem para a ativação do fator de transcrição chamado proteína de ligação ao elemento de resposta a 3,5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) (CREB), que aumenta a transcrição de vários genes, incluindo o do próprio BDNF. Por outro lado, o pró-BDNF se liga em receptores

p75, podendo estimular a apoptose, através da via da cinase N-terminal c-Jun (JNK), ou estimular a sobrevivência celular, através da via do fator nuclear kappa B (NFκB) (HEMPSTEAD, 2002; HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004; MALBERG, 2004; TARDITO *et al.*, 2006; CUNHA, BRAMBILLA e THOMAS, 2010).

Figura 3. Via de sinalização do BDNF



Legenda: A ligação do BDNF ao seu receptor TrkB induz sua dimerização e autofosforilação em resíduos de tirosina. A ativação de TrkB induz a ativação de vias de sinalização intracelular como PLC, PI3K e ERK. Estas vias, quando ativadas, induzem a fosforilação e ativação do fator de transcrição nuclear CREB, que por sua vez aumenta a transcrição de genes, como o do BDNF. Por outro lado, o pró-BDNF se liga ao receptor p75, levando a apoptose através da cascata da JNK ou a sobrevivência celular através da cascata do NFkB. Abreviaturas: Akt, proteína cinase B; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; CAMKII, proteína cinase dependente de Ca²⁺/calmodulina; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; ERK, proteína cinase regulada por sinal extracelular; Gab1, ligante 1 associado à Grb2; Grb2, proteína de ligação do receptor do fator de crescimento 2; IRS1/2, substrato do receptor de insulina 1/2; JNK, cinase N-terminal c-Jun; MEK, ERK cinase; NFkB, fator nuclear kappa B; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinase; PLC, fosfolipase C; Raf, fator associado ao Ras; Ras, proteína de ligação ao GTP; Shc, domínio contendo homologia ao src; SOS, *son of sevenless*; TrkB, receptor tropomiosina cinase B. Fonte: adaptado de Cunha, Brambilla e Thomas (2010).

Além das hipóteses monoaminérgica e neurotrófica, vários estudos de investigação de bases biológicas da depressão tem focando no papel de circuitos neurais e sinapses, bem como nos processos que controlam essas funções. Neste contexto, vários estudos tem

evidenciado o papel da neurotransmissão glutamatérgica na fisiopatologia e tratamento dos transtornos psiquiátricos (NICIU, KELMENDI e SANACORA, 2012; SANACORA, TRECCANI e POPOLI, 2012; DUMAN, 2014b).

1.1.3 Neurotransmissão glutamatérgica e depressão

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) e é importante para diversas funções normais cerebrais, incluindo cognição, memória e aprendizado (DANBOLT, 2001). O glutamato pode ser sintetizado a partir do intermediário do ciclo do ácido cítrico α -cetoglutarato (pela ação da enzima glutamato desidrogenase ou de enzimas aminotransferases) ou a partir da glutamina (pela ação da enzima glutaminase) (SCHOUSBOE, BAK e WAAGEPETERSEN, 2013).

O sistema glutamatérgico tem uma sinapse tripartite, constituída de neurônio pré-sináptico, neurônio pós-sináptico e astrócitos (SCHOUSBOE, BAK e WAAGEPETERSEN, 2013). Após o glutamato ser sintetizado no neurônio pré-sináptico, ele é armazenado em vesículas pré-sinápticas através dos transportadores de glutamato vesicular (TAKAMORI, 2006). Após a despolarização, as vesículas sinápticas se fundem com a membrana plasmática do neurônio pré-sináptico, liberando o glutamato para a fenda sináptica. Uma vez na fenda sináptica, o glutamato pode difundir-se, se ligar em seus receptores específicos e, desse modo, mediar diversas ações em sítios pré e pós-sinápticos ou em sítios gliais. Depois de exercer suas funções, o glutamato pode ser eliminado da fenda sináptica após interação com transportadores presentes no neurônio pré ou pós-sinápticos e, principalmente, nos astrócitos. Dentro dos astrócitos, o glutamato pode ser convertido em glutamina (pela ação da enzima glutamina sintetase), que pode ir para o neurônio pré-sináptico para uma nova síntese de glutamato, ou ser convertido a α -cetoglutarato, servindo de intermediário para o ciclo do ácido cítrico (MATHEWS, HENTER e ZARATE, 2012; POPOLI *et al.*, 2012; SCHOUSBOE, BAK e WAAGEPETERSEN, 2013; HILLHOUSE e PORTER, 2015).

Os receptores de glutamato se subdividem em receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos, quando ativados, permitem a entrada de íons catiônicos (principalmente íons cálcio e sódio) para o interior do neurônio pós-sináptico. Esses receptores ionotrópicos incluem o receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato (KEW e KEMP, 2005). Todos os três tipos de receptores ionotrópicos

são tetrâmeros, sendo que os receptores NMDA são obrigatoriamente heterotetrâmeros, enquanto que os receptores AMPA e cainato podem ser homo ou heterotetrâmeros. Além disso, cada subunidade de cada receptor possui 4 domínios: o domínio amino-terminal, domínio de ligação ao ligante, domínio transmembrana e domínio carboxi-terminal (KARAKAS, REGAN e FURUKAWA, 2015).

Os receptores AMPA são os responsáveis pela despolarização inicial do potencial pós-sináptico e podem ter 4 tipos de subunidades: GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4 (STONE e ADDAE, 2002; LI, CHEN e SMIT, 2013). De acordo com a constituição das subunidades, esse tipo de receptor pode ser permeável ao sódio (na maioria das vezes) ou ao cálcio (KEW e KEMP, 2005). Os receptores cainato diferenciam-se dos receptores AMPA pela menor corrente conduzida e pela cinética de desativação mais lenta (HUETTNER, 2003) e são permeáveis principalmente ao sódio e, em menor quantidade, ao cálcio (KEW e KEMP, 2005). Esses receptores são tetrâmeros que podem ser formados a partir da associação de cinco tipos de subunidades: GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 e GluK5 (REINER, ARANT e ISACOFF, 2012). Já os receptores NMDA são subtipo de receptores que possuem maior afinidade pelo glutamato (NICIU, KELMENDI e SANACORA, 2012) e são permeáveis ao sódio e principalmente ao cálcio (KEW e KEMP, 2005). Esse tipo de receptor pode ser formado pelas subunidades GluN1, GluN2 (GluN2A – GluN2D) e GluN3 (GluN3A e GluN3B) (PAOLETTI, BELLONE e ZHOU, 2013). A subunidade GluN1, em combinação com pelo menos um tipo da subunidade GluN2, é obrigatória para a funcionalidade do receptor NMDA (HARDINGHAM, 2009; WYLLIE, LIVESEY e HARDINGHAM, 2013). Vale destacar que, de acordo com a composição das subunidades dos receptores NMDA, ele pode ter distribuição, propriedades e regulações distintas no encéfalo, possuindo características funcionais e farmacológicas heterogêneas devido à composição destas subunidades (GONDA, 2012).

Por outro lado, os receptores metabotrópicos estão associados à proteínas G que ativam vias de sinalização específicas dentro do neurônio pós-sináptico. Existem 8 subtipos de receptores metabotrópicos que são divididos em três classes de acordo com a homologia e função. O grupo I (mGlu1 e mGlu5) é positivamente acoplado a hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato através da proteína G_q (que ativará a fosfolipase C, permitindo a clivagem do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato em fosfatidilinositol-1,4,5-trifosfato e diacilglicerol). Já o grupo II (mGlu2 e mGlu3) e grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8) são negativamente acoplados à adenilato

ciclase via proteína G_i , ou seja, ocorrerá uma inibição da adenilato ciclase após a ligação do glutamato nesse tipo de receptor, diminuindo a quantidade do AMPc (GUBELLINI *et al.*, 2004; POMIERNY-CHAMIOLO *et al.*, 2014).

Como o glutamato é amplamente distribuído no SNC, seus receptores também possuem uma ampla distribuição. Os receptores metabotrópicos estão localizados tanto pré-sinápticamente quanto pós-sinápticamente (NICIU, KELMENDI e SANACORA, 2012). Já os receptores ionotrópicos, estão presentes principalmente pós-sinápticamente, embora já tenha sido demonstrada a presença de receptores ionotrópicos no neurônio pré-sináptico, sugerindo que eles também podem responder à liberação de glutamato sináptico (GILL *et al.*, 2015). Dentre os receptores glutamatérgicos, o de mais importância para o presente trabalho são os receptores NMDA. No encéfalo adulto, os receptores NMDA que predominam são os formados pelas subunidades GluN1 e GluN2A, que possuem distribuição ubíqua no encéfalo. Os receptores NMDA constituídos das subunidades GluN1 e GluN2B são expressos apenas no prosencéfalo (telencéfalo e diencéfalo), sendo que as regiões com maior expressão são o córtex, hipocampo, amígdala, núcleo ventral do tálamo e bulbo olfatório. Os receptores constituídos das subunidades GluN1 e GluN2C ou GluN1 e GluN2D são menos expressos no encéfalo e em regiões relacionadas à depressão: GluN2C está presente principalmente no cerebelo e GluN2D no tronco encefálico e diencéfalo (GONDA, 2012).

Outros elementos importantes para a neurotransmissão glutamatérgica são os transportadores que captam o glutamato da fenda sináptica, que são comumente chamados de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) (JIANG e AMARA, 2011). Os EAATs pertencem a uma família de transportadores chamada SLC1, que também incluem dois transportadores (ASCT1 e ASCT2) para aminoácidos neutros, como a serina, alanina, cisteína e treonina. Os EAATs captam um glutamato de forma simporte com três íons sódio e um próton e um antiporte de um íon potássio (KANAI *et al.*, 2013; DIVITO e UNDERHILL, 2014; JENSEN *et al.*, 2015). Além do glutamato, esses EAATs também podem captar outros ácidos dicarboxílicos, como por exemplo, o aspartato (DANBOLT, 2001; KANAI *et al.*, 2013).

Existem cinco subtipos de EAAT (EAAT1-5 em humanos), sendo que em roedores, EAAT1, EAAT2 e EAAT3 são chamados, respectivamente, de GLAST, GLT-1 e EAAC1 (VANDENBERG e RYAN, 2013; ZHOU e DANBOLT, 2013). EAAT1 e EAAT2 possuem

uma organização homotrimérica, enquanto que EAAT3 e EAAT4 podem formar homotrímeros ou heterotrímeros associando EAAT3/EAAT4 (VANDENBERG e RYAN, 2013; JENSEN *et al.*, 2015). EAAT1 e EAAT2 são encontrados, predominantemente, nas células gliais, enquanto que EAAT3-EAAT5 são transportadores específicos de neurônios (DIVITO e UNDERHILL, 2014; JENSEN *et al.*, 2015). Vale destacar que EAAT1-3 também foram identificados fora do SNC, como no coração, fígado, intestino e rins (BRIDGES e ESSLINGER, 2005).

O EAAT2 foi o primeiro transportador a ser isolado e é amplamente encontrado em astrócitos de todas as regiões encefálicas e da medula espinhal, com um aumento significativo no hipocampo e neocórtex. Alguns neurônios pré-sinápticos também expressam EAAT2, principalmente no hipocampo, embora isso corresponda a menos de 10% de todo o EAAT2 encefálico (VANDENBERG e RYAN, 2013; ZHOU e DANBOLT, 2013). Vale destacar que o EAAT2 é o principal transportador responsável pela captação do glutamato, captando cerca de 90% de todo o glutamato encefálico (JENSEN *et al.*, 2015). O EAAT1 foi encontrado pela primeira vez em astrócitos, sendo encontrado principalmente no cerebelo, ouvido interno, órgãos circunventriculares e retina. O EAAT1 também pode ser encontrado, embora em baixa concentração, na região CA1 do hipocampo. O EAAT3 é expresso predominantemente nos neurônios do hipocampo, embora ele também possa ser encontrado em neurônios do cerebelo e gânglios basais. Vale destacar que o EAAT3 tem localização predominantemente não sináptica, estando localizando principalmente no corpo celular ou nos dendritos dos neurônios, embora ele possa ser rapidamente mobilizado e expresso na membrana plasmática. Ou seja, o EAAT3 é mais importante para o metabolismo ou homeostase celular do que para a regulação direta da transmissão sináptica (DANBOLT, 2001; VANDENBERG e RYAN, 2013; ZHOU e DANBOLT, 2013). O EAAT4 é expresso predominantemente em neurônios do cerebelo, embora outras regiões encefálicas também possam expressá-lo em pequena quantidade. Uma pequena quantidade de EAAT4 pode ser expressa próximo à sinapse, mas a maior parte desse transportador é expressa nos dendritos próximos aos astrócitos e em menor quantidade, no corpo celular. O EAAT5, por sua vez, é expresso quase predominantemente em neurônios da retina, sendo identificado nos terminais dos fotorreceptores dos cones e bastonetes e nos terminais axonais das células bipolares dos bastonetes. Assim, na retina, o EAAT5 influencia diretamente a neurotransmissão glutamatérgica (VANDENBERG e RYAN, 2013;

ZHOU e DANBOLT, 2013). A **Tabela 2** mostra as principais localizações dos EAATs no SNC.

Tabela 2. Localização dos EAATs

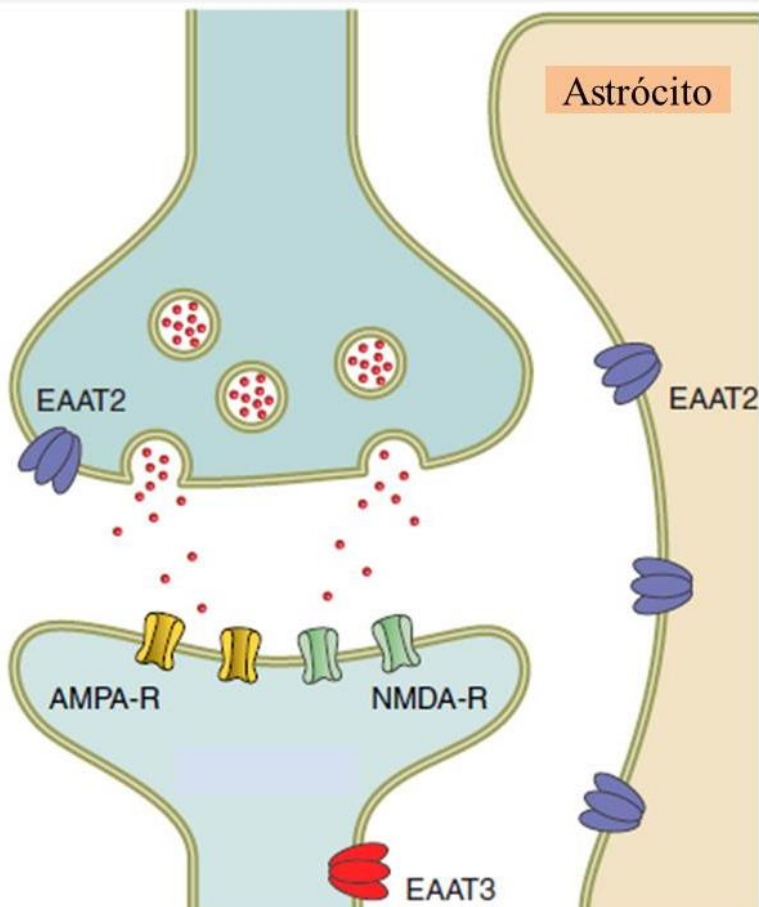
EAAT	Localização
EAAT1/GLAST	Astrócitos principalmente do cerebelo, ouvido interno, órgãos circunventriculares e retina.
EAAT2 / GLT-1	Astrócitos de todas as regiões cerebrais e da medula espinhal, com aumento significativo no hipocampo e neocórtex; neurônios pré-sinápticos do hipocampo.
EAAT3/EAAC1	Predominantemente em neurônios do hipocampo.
EAAT4	Predominantemente em neurônios do cerebelo.
EAAT5	Predominantemente em neurônios da retina.

Abreviatura: EAAT, transportador de aminoácido excitatório. Fonte: adaptado de Zhou e Danbolt (2013).

Uma ressalva deve ser feita em relação ao EAAT3 (EAAC1): além dele ser importante para captar o glutamato, ele também é capaz de transportar cisteína para dentro do neurônio, sugerindo que esse transportador também seja importante para a síntese de glutathione e consequente proteção contra o estresse oxidativo (CHEN e SWANSON, 2003; BIANCHI *et al.*, 2014; ROBERT *et al.*, 2014). Animais *knockout* para EAAT3 têm uma diminuição neuronal de glutathione reduzida e um aumento do estresse oxidativo, que podem ser revertidos pela suplementação com N-acetil-cisteína (AOYAMA *et al.*, 2006; CAO, LI e ZUO, 2012). Vale ressaltar que já foi demonstrado que o EAAT3 tem sua transcrição aumentada pela via do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)/elemento de resposta a antioxidante (ARE), aumentando a síntese de glutathione neuronal (ESCARTIN *et al.*, 2011).

A **Figura 4** mostra um esquema dos principais transportadores de glutamato no hipocampo, que como já mencionado, é uma região relacionada com a depressão. Como pode ser observado, no hipocampo existe a presença de EAAT3 nos neurônios pós-sinápticos (na região extra-sináptica) e de EAAT2 nos astrócitos e, em menor quantidade, no neurônio pré-sináptico (VANDENBERG e RYAN, 2013).

Figura 4. Localização dos principais EAATs no hipocampo



Legenda: Diagrama esquemático mostrando a localização dos principais EAATs no hipocampo. O EAAT2 encontra-se principalmente nos astrócitos e, em menor quantidade, em neurônios pré-sinápticos. EAAT3 encontra-se principalmente em neurônios pós-sinápticos. Receptores como AMPA e NMDA encontram-se principalmente nos neurônios pós-sinápticos. Abreviaturas: AMPA-R, receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato; EAAT, transportador de aminoácido excitatório; NMDA-R, receptor N-metil-D-aspartato. Fonte: adaptado de Vandenberg e Ryan (2013).

Os níveis de glutamato extracelular também podem ser controlados por um trocador de cistina-glutamato, chamado sistema x_c^- . Este trocador é expresso tanto fora do SNC (ex: hepatócitos, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, etc) quanto dentro do SNC (ex: astrócitos, micróglia, neurônios corticais imaturos, etc). O sistema x_c^- medeia a troca de uma molécula de cistina (forma oxidada da cisteína) extracelular por uma molécula de glutamato intracelular, contribuindo para a manutenção da concentração de glutamato na fenda sináptica, bem como para a produção de glutamato intracelular (BRIDGES, NATALE e PATEL, 2012; LEWERENZ *et al.*, 2013).

Embora a neurotransmissão glutamatérgica seja essencial às funções neurais, o excesso de glutamato na fenda sináptica é prejudicial e está associado com diversas doenças do SNC. Entre elas, destacam-se as doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica (HYND, SCOTT e DODD, 2004; SHELDON e ROBINSON, 2007; MEHTA *et al.*, 2013), bem como transtornos de humor, incluindo a depressão (SANACORA *et al.*, 2008; ZARATE *et al.*, 2010; HILLHOUSE e PORTER, 2015). O papel negativo do excesso de glutamato ocorre devido ao fato de que a hiperestimulação dos receptores glutamatérgicos podem propiciar uma série de eventos que podem diminuir a viabilidade celular, incluindo um grande influxo de íons cálcio, a liberação de óxido nítrico, um aumento da formação de espécies reativas de oxigênio e ativação de proteases (como as caspases) e cinases (LAU e TYMIANSKI, 2010; WANG e QIN, 2010).

Em relação ao papel da neurotransmissão glutamatérgica na depressão, estudos clínicos evidenciam que pacientes com depressão, quando comparados com indivíduos saudáveis, têm um aumento nos níveis de glutamato no plasma (MAURI *et al.*, 1998; KUCUKIBRAHIMOGLU *et al.*, 2009) e no córtex pré-frontal (HASHIMOTO, SAWA e IYO, 2007), bem como um aumento de glutamina no líquido cerebrospinal (LEVINE *et al.*, 2000). Por outro lado, o tratamento com antidepressivos é capaz de diminuir a concentração de glutamato no plasma (MAES *et al.*, 1998; KUCUKIBRAHIMOGLU *et al.*, 2009) e de glutamina no líquido cerebrospinal (GARAKANI *et al.*, 2013), sugerindo que os antidepressivos que agem na modulação da neurotransmissão monoaminérgica, também podem modular a neurotransmissão glutamatérgica. Estudos pós-morte em humanos com depressão ou vítimas de suicídio também demonstraram alterações nas subunidades do receptor NMDA. Feyissa *et al.* (2009) demonstraram uma redução

nas subunidades GluN2A e GluN2B no córtex pré-frontal. Por outro lado, Sowa-Kucma *et al.* (2013) evidenciaram um aumento na subunidade GluN2A e diminuição da GluN2B no hipocampo, enfatizando que alterações da neurotransmissão glutamatérgica podem ocorrer em pacientes com depressão. Corroborando estes dados, uma recente revisão sobre o tema também sugere que, em vários estudos pós-morte com pacientes com depressão, alterações das subunidades do receptor NMDA (diminuição ou aumento, de acordo com as subunidades ou regiões avaliadas) eram encontradas em regiões específicas do encéfalo, principalmente córtex pré-frontal e *locus coeruleus* (HILLHOUSE e PORTER, 2015). Digno de nota, um estudo piloto analisando a metilação do DNA no córtex pré-frontal e hipocampo demonstrou que os pacientes depressivos tinham uma hipermetilação do GRIN2A, que é o gene que codifica a subunidade GluN2A, reforçando a ideia de que a neurotransmissão glutamatérgica está envolvida da fisiopatologia da depressão (KAUT *et al.*, 2015).

Além do exposto, uma abordagem terapêutica baseada no uso de antagonistas do receptor NMDA (ex: cetamina) também tem sido estudada em pacientes com depressão. A cetamina é um antagonista não competitivo do receptor NMDA, usada tradicionalmente como anestésico e irregularmente como droga de abuso (DOMINO, 2010; HILLHOUSE e PORTER, 2015). Doses subanestésicas de cetamina têm sido testadas em pacientes com depressão desde o ano 2000. Neste estudo foi demonstrado que uma única dose de cetamina melhorou os sintomas depressivos em pacientes refratários a tratamentos convencionais após 4 horas de administração e, que esse efeito, perdurou por 4 dias (BERMAN *et al.*, 2000). A partir de 2006, os estudos com o uso de cetamina em pacientes com depressão começaram a se intensificar, reforçando a ideia de que esse medicamento é capaz de induzir efeitos rápidos (que podem aparecer a partir de 60 minutos após a administração) e duradouros, mesmo após uma dose única de cetamina (cujos efeitos podem persistir por até 15 dias) ou doses repetidas (cujos efeitos podem persistir por até 83 dias) (ZARATE *et al.*, 2006; AAN HET ROT *et al.*, 2010; IRWIN e IGLEWICZ, 2010; MCNULTY e HAHN, 2012; IRWIN *et al.*, 2013; LARA, BISOL e MUNARI, 2013; MURROUGH *et al.*, 2013a; MURROUGH *et al.*, 2013b; CHILUKURI *et al.*, 2014; GHASEMI *et al.*, 2014; LAPIDUS *et al.*, 2014).

Estudos moleculares, celulares e pré-clínicos buscam entender os mecanismos pelos quais esses moduladores da neurotransmissão glutamatérgica, em especial a cetamina, desempenham suas funções na melhora dos sintomas da depressão. Resumidamente, os estudos

demonstram que a cetamina aumenta a sinaptogênese, incluindo o aumento da função e densidade das espinhas dendríticas, em especial, no córtex pré-frontal (LI *et al.*, 2010; DUMAN *et al.*, 2012). Além disso, a cetamina também reverte os déficits sinápticos ocasionados por protocolo de estresse crônico (LI *et al.*, 2011). Esses efeitos são acompanhados, pelo menos em parte, pelo aumento na liberação de BDNF, pela ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e do aumento de proteínas sinápticas (ex: PSD95, sinapsina I) (LI *et al.*, 2010; DUMAN *et al.*, 2012). Entretanto, nem todos os mecanismos foram totalmente elucidados.

Vale destacar que outros medicamentos que também influenciam na neurotransmissão glutamatérgica também têm sido testados em pacientes com depressão, como por exemplo, a memantina (antagonista não competitivo do receptor NMDA) (LENZE *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2013), lanicemina (bloqueador do canal do receptor NMDA) (ZARATE *et al.*, 2013; SANACORA *et al.*, 2014), traxoprodil (antagonista seletivo da subunidade GluN2B do receptor NMDA) (PRESKORN *et al.*, 2008), riluzol (aumenta a captação de glutamato pelo EAAT2) (ZARATE *et al.*, 2004; SANACORA *et al.*, 2007), entre outros. Entretanto, a presença de efeitos colaterais, como por exemplo, tontura, sedação, sonolência, perda de apetite, náuseas e vômitos, é um dos fatores que prejudica o amplo uso clínico desses tipos de fármacos (CVRCEK, 2008).

Ressalta-se que a expressão de alguns EAACs também pode estar alterada em animais submetidos aos protocolos de estresse e/ou depressão. Em relação ao GLT-1 (EAAT2), os estudos ainda são controversos. Alguns estudos mostram que protocolos de depressão e/ou estresse em animais são capazes de aumentar a expressão de GLT-1 no hipocampo (REAGAN *et al.*, 2004; AUTRY *et al.*, 2006; RAUDENSKY e YAMAMOTO, 2007) e que antidepressivos inibem esse aumento (REAGAN *et al.*, 2004). Por outro lado, outros estudos mostram que esses protocolos de estresse e/ou depressão desencadeiam uma diminuição na expressão do GLT-1 no hipocampo, córtex, estriado ou na matéria cinzenta periaquedutal (ZINK *et al.*, 2010; GOURLEY *et al.*, 2012; IMBE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013b; CHEN *et al.*, 2014) e que antidepressivos impedem essa diminuição ou levam a um aumento na expressão desse transportador no hipocampo ou córtex (ZINK *et al.*, 2011; GOURLEY *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014). Já em relação ao papel do EAAC1 (EAAT3) na depressão existem poucos estudos e, os que existem, tem resultados controversos. Em um dos estudos foi demonstrado uma diminuição na expressão do EAAC-1 no hipocampo

de ratos que foram estressados no período pré-natal (ZHANG *et al.*, 2013b), enquanto que em outro estudo (com ratos submetidos ao um modelo de depressão baseado no desamparo aprendido), nenhuma alteração na expressão do EAAC1 nem no hipocampo e nem no córtex foi observada (ZINK *et al.*, 2010).

Outra questão que pode influenciar, embora que mais indiretamente, a neurotransmissão glutamatérgica, bem como a depressão, é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) ou situações que desencadeiem alterações na GFAP, como astrogliose (MIDDELDORP e HOL, 2011; POPOLI *et al.*, 2012).

1.1.4 Função astrocitária, GFAP e depressão

Tendo em vista a importância dos astrócitos na captação do glutamato, alterações nessas células também podem representar um elo entre o sistema glutamatérgico e a depressão (RAJKOWSKA e MIGUEL-HIDALGO, 2007). A astrogliose, também chamada de astrogliose reativa, é caracterizada pela ativação do astrócito em resposta a um trauma, doença, insulto químico ou alteração genética, sendo acompanhada de alterações morfológicas e funcionais dos astrócitos (ENG, GHIRNIKAR e LEE, 2000; HOL e PEKNEY, 2015). Dentre as várias consequências da astrogliose, destaca-se a diminuição da enzima glutamina sintetase, resultando em depleção de glutamina e como consequência, uma diminuição do ácido gama aminobutírico (GABA), ocasionando uma hiperexcitabilidade nos neurônios hipocampais (ORTINSKI *et al.*, 2010). Além disso, a astrogliose pode diminuir os níveis de GLT-1 e *up*-regular o sistema x_c^- , aumentando ainda mais o glutamato sináptico (CIRILLO *et al.*, 2011; COLANGELO, ALBERGHINA e PAPA, 2014).

Embora as situações de astrogliose estejam associadas com excesso de glutamato, uma diminuição da proliferação de células progenitoras gliais ou aumento de apoptose de astrócitos, também pode alterar a neurotransmissão glutamatérgica (POPOLI *et al.*, 2012). Ou seja, tanto uma situação de astrogliose quanto uma situação de diminuição na quantidade dos astrócitos podem influenciar na neurotransmissão glutamatérgica. Dentre as proteínas que auxiliam para avaliar situações de astrogliose (em que os astrócitos estão hiper-reativos) ou de diminuição do número de astrócitos destaca-se a GFAP.

A GFAP é a principal integrante do filamento intermediário do astrócito maduro (ENG, GHIRNIKAR e LEE, 2000). Embora a GFAP tenha sido descoberta primeiramente em astrócitos, hoje se sabe que ela também está presente em outras células, como células de Schwann,

condrócitos, fibroblastos, linfócitos, entre outras (MIDDELDORP e HOL, 2011). No SNC, a expressão da GFAP é induzida por diversos fatores, incluindo injúria encefálica ou doenças como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla (MIDDELDORP e HOL, 2011; HOL e PEKNY, 2015).

A função clássica da GFAP é auxiliar na estrutura e função do citoesqueleto da célula, fornecendo suporte mecânico para a membrana plasmática. Além disso, acredita-se que a GFAP está envolvida em uma série de funções/processos cerebrais, como por exemplo, migração e proliferação de astrócitos, plasticidade sináptica, crescimento dos neuritos, mielinização, função da barreira hematoencefálica, injúria ou proteção e neurotransmissão glutamatérgica. Entretanto, as exatas funções da GFAP ainda são questionáveis, apesar dos estudos utilizarem-na como marcador de astrócitos (MIDDELDORP e HOL, 2011).

A GFAP tem sua síntese rapidamente aumentada em situações de astrogliose, que como já mencionado, também está associado com um aumento na liberação de glutamato (ENG, GHIRNIKAR e LEE, 2000; HOL e PEKNY, 2015). Por outro lado, em situações de aumento de apoptose de astrócitos ou diminuição da proliferação de células progenitoras gliais, ocorre uma diminuição da GFAP. Vale destacar que já foi demonstrado que animais sem GFAP tem menos EAAT1 e EAAT3 nas frações sinaptossomais corticais. Análise histoquímica também evidenciou que o tráfego do EAAT3 estava alterado. No mesmo estudo, em cultura de astrócitos corticais preparada a partir de animais sem GFAP também foi demonstrado uma incapacidade no tráfego do EAAT2 para a superfície celular (HUGHES *et al.*, 2004).

Digno de nota, a GFAP pode estar alterada em situações como doenças neurodegenerativas, isquemia, trauma, estresse e depressão (LIU *et al.*, 2011; MIDDELDORP e HOL, 2011; POPOLI *et al.*, 2012). Os estudos com modelos animais de depressão e/ou estresse demonstram uma diminuição na expressão ou imunomarcagem para GFAP no hipocampo (CZECH *et al.*, 2006; BANASR e DUMAN, 2008; LIU *et al.*, 2009; 2011), córtex pré-frontal (BANASR *et al.*, 2010), córtex pré-central medial (MUSHOLT *et al.*, 2009) ou na matéria cinzenta periaquedutal (IMBE *et al.*, 2012). Por outro lado, o tratamento com antidepressivo impede essas alterações nos níveis de GFAP (CZECH *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; BANASR *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011), corroborando os achados que demonstram que pacientes com depressão tem menor volume de algumas regiões cerebrais, especialmente o

hipocampo e que o tratamento com antidepressivos pode reverter essa alteração (CZECH e LUCASSEN, 2007).

Corroborando esses dados, um estudo em humanos também demonstrou uma diminuição no imunoconteúdo da GFAP no córtex pré-frontal dorsolateral de pacientes jovens com depressão (SI *et al.*, 2004). Outro estudo com humanos depressivos (cuja idade não foi revelada) também demonstrou uma diminuição no imunoconteúdo da GFAP no cerebelo desses pacientes (FATEMI *et al.*, 2004). Já em pacientes idosos com depressão, foi evidenciada uma diminuição na imunorreatividade para GFAP na matéria cinzenta da camada V do córtex pré-frontal dorsolateral. Por outro lado, houve um aumento na imunorreatividade para GFAP na matéria cinzenta da camada I, bem como na matéria branca do córtex pré-frontal dorsolateral (DAVIS *et al.*, 2002). Ou seja, os estudos em humanos com depressão ainda são controversos, variando principalmente de acordo com a idade dos pacientes, o que sugere que a expressão da GFAP pode ser diferente de acordo com a idade do paciente (se a depressão ocorre mais no início ou em uma fase mais avançada da vida). Isso faz alguns autores sugerirem que os mecanismos subjacentes à depressão possam variar de acordo com a idade do indivíduo (RAJKOWSKA e MIGUEL-HIDALGO, 2007).

Embora o envolvimento do sistema monoaminérgico, glutamatérgico e dos fatores neurotróficos tenham sido explanados separadamente, é importante ressaltar que, na maioria das vezes, ocorrem alterações simultâneas entre esses sistemas. Um dos principais fatores de risco para o desencadeamento da depressão e que pode alterar esses e outros sistemas/fatores envolvidos na fisiopatologia da depressão é o estresse (DURIC e DUMAN, 2013).

1.1.5 Estresse e depressão

A depressão frequentemente é descrita como um transtorno relacionado ao estresse, ocorrendo, muitas vezes, em um contexto de uma situação estressante (NESTLER *et al.*, 2002; HAMMEN, 2005). Um estudo de 1990, realizado com 1755 indivíduos, já havia demonstrado que o estresse crônico (estresse por mais de 12 meses) tem correlação positiva com o aparecimento de sintomas depressivos quando comparado com estresse agudo (MCGONAGLE e KESSLER, 1990). O papel do estresse na depressão tem tanto impacto que essa relação continua sendo estudada ainda nos dias de hoje. Um estudo mais recente com mais de 14 mil pessoas em 17 países diferentes apontou que pessoas com maior grau de estresse tinham um risco pelo menos 60% maior de apresentar sintomas depressivos quando comparados com

indivíduos menos estressados, corroborando as evidências de que o estresse pode ser um fator de risco ou causal para sintomas depressivos (SIEGRIST *et al.*, 2012).

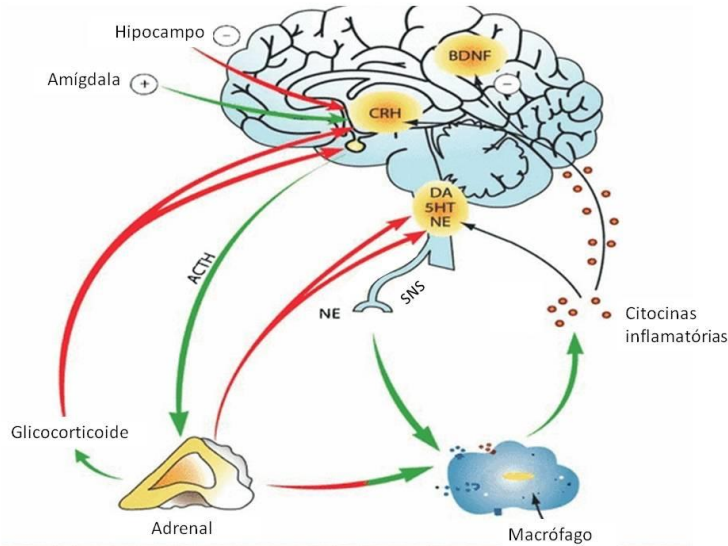
Vale destacar que o estresse agudo, definido como um estado de homeostase ameaçada após a exposição a forças adversas extrínsecas ou intrínsecas (estressores), gera uma resposta fisiológica e extrema importância ao indivíduo. Em situação de estresse agudo, o organismo responde ativando o eixo HPA (CHROUSOS e GOLD, 1992). Como esquematizado na **Figura 5**, diante de um estímulo estressor, as células do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que agirá na hipófise anterior ativando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH cai na corrente sanguínea e pode, nas adrenais, estimular a liberação de glicocorticoides pelo córtex dessa glândula. Os principais glicocorticoides são o cortisol em humanos ou corticosterona em roedores (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; GILLESPIE e NEMEROFF, 2005; KYROU e TSIGOS, 2009; XIONG e ZHANG, 2013).

O CRH também age como neurotransmissor ou neuromodulador na amígdala, núcleo dorsal da rafe, hipocampo e *locus coeruleus*, integrando o encéfalo em resposta ao estresse. No *locus coeruleus*, por exemplo, o CRH aumenta a neurotransmissão noradrenérgica, que está associada com a diminuição das funções neurovegetativas, tais como comer e dormir. Vale destacar que a ativação de neurônios produtores de norepinefrina tem sido relatada em resposta a diversos estressores e que a norepinefrina também inerva o núcleo paraventricular do hipotálamo, estimulando a liberação do CRH (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003).

Um estudo em humanos demonstrou que fatores estressantes são capazes de ativar o fator nuclear κ B (associado com aumento de citocinas inflamatórias) via estímulo adrenérgico dependente de norepinefrina (BIERHAUS *et al.*, 2003). Enquanto a norepinefrina (liberada via sistema nervoso simpático) age nos macrófagos aumentando as citocinas pró-inflamatórias, os glicocorticoides agem diminuindo essas citocinas. Entretanto, os glicocorticoides também podem exercer efeitos pró-inflamatórios de acordo com as concentrações, tempo de exposição ou com o tipo de células (MCEWEN, 2008). Já foi demonstrado, por exemplo, que a exposição crônica de glicocorticoides em cultura hipocampal primária exacerbou a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida pelo ácido cáfnico (MACPHERSON, DINKEL e SAPOLSKY, 2005). Digno de nota, as

citocinas inflamatórias podem influenciar diversos neurotransmissores e/ou funções cerebrais, incluindo diminuição nos níveis de serotonina, dopamina, norepinefrina e BDNF, bem como atuando no próprio eixo HPA, estimulando ainda mais esse eixo (RAISON, CAPURON e MILLER, 2006).

Quando o eixo HPA está funcionando normalmente, a resposta neuroendócrina ao estresse é contra regulada por um mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticoides sobre os componentes do SNC, diminuindo a liberação de CRH e ACTH, causando posterior diminuição dos glicocorticoides (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; GILLESPIE e NEMEROFF, 2005; KYROU e TSIGOS, 2009). Vale destacar que o hipocampo também participa do controle da ativação do eixo HPA, através da inibição dos neurônios hipotalâmicos secretores de CRH. (NESTLER *et al.*, 2002; HERMAN *et al.*, 2005; FRODL e O'KEANE, 2013). Por outro lado, a amígdala pode estimular a liberação do CRH (MAKINO, HASHIMOTO e GOLD, 2002; TSIGOS e CHROUSOS, 2002; HERMAN *et al.*, 2005; FLANDREAU *et al.*, 2012).

Figura 5. Eixo HPA

Legenda: Em situações de estresse ocorre liberação, pelo hipotálamo, do CRH, que irá estimular a liberação de ACTH pela hipófise (pituitária) anterior. O ACTH é liberado na corrente sanguínea, chegando até as adrenais, onde estimula a liberação de cortisol. O cortisol, por sua vez, além de exercer seus efeitos fisiológicos periféricos, agirá à nível de hipotálamo e hipófise, diminuindo a liberação de CRH e ACTH (mecanismo chamado de retroalimentação negativa). O hipocampo também controla o eixo HPA, inibindo os neurônios hipotalâmicos que secretam o CRH. Já a amígdala, estimula a liberação de CRH. O estresse também estimula a liberação de NE pelo SNS, culminando em um aumento de citocinas inflamatórias pelos macrófagos. Os glicocorticoides, de acordo com a dose/tempo/tipo de célula podem aumentar ou inibir a produção de citocinas inflamatórias. As citocinas inflamatórias podem influenciar no eixo HPA, nos níveis de BDNF, bem como nos níveis de 5HT, NE e DA. Os glicocorticoides também podem influenciar nos níveis de 5HT, NE e DA. Flechas em verdes significam estímulo; flechas em vermelho significam inibição. Abreviaturas: 5HT, serotonina; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; DA, dopamina; HPA, eixo hipotálamo-pituitária-adrenal; NE, norepinefrina; SNS, sistema nervoso simpático. Fonte: adaptado de Maletic *et al.* (2007).

Vale destacar que algumas das alterações fisiológicas associadas com a resposta ao estresse agudo geram a resposta de luta-ou-fuga, que incluem: a) mobilização de energia para manter as taxas de perfusão encefálica e utilização de glicose encefálica local; b) melhora na função encefálica e muscular; c) atenção aguçada para a ameaça percebida; d) aumento cardiovascular e na respiração e redistribuição de fluxo de sangue, aumentando a entrega do substrato e energia para o encéfalo e para os músculos; e) modulação da função imunológica; f) inibição da fisiologia reprodutiva e comportamento sexual; g) diminuição da alimentação e do apetite (SAPOLSKY, 2000; CARRASCO e VAN DE KAR, 2003). À nível molecular, essas mudanças em resposta ao estresse são desencadeadas por alterações, principalmente, na expressão de proteínas, moduladas pela ligação dos glicocorticoides em receptores mineralocorticoides tipo I ou receptores glicocorticoides tipo II (XIONG e ZHANG, 2013). Assim, os glicocorticoides interagem com seus receptores em múltiplos tecido-alvos, desencadeando suas ações. No encéfalo, quando os níveis de glicocorticoides estão mais baixos, ocorre uma ativação predominante dos receptores mineralocorticoides. Por outro lado, quando os níveis de glicocorticoides estão mais altos, existe um predomínio de ocupação dos receptores glicocorticoides (JOELS e DE KLOET, 1994). Vale destacar que, quando em quantidade adequadas, os glicocorticoides exercem várias funções cerebrais, incluindo papel na atenção, percepção, memória e processamento emocional (ERICKSON, DREVETS e SCHULKIN, 2003).

É interessante ressaltar que diferentes tipos de estresse podem ativar circuitos neuronais distintos. Estresse físico ou reativo, bem como estímulos fisiológicos agudos que são uma ameaça à vida e exigem reações imediatas ocasionam uma estimulação rápida do tronco encefálico e do hipotálamo para ativar vias viscerais eferentes que estão diretamente relacionadas com o núcleo paraventricular do hipotálamo. Em contraste, os estressores psicológicos ou antecipatórios propiciam uma ativação de estruturas cerebrais de ordem superior para maiores interpretações do perigo percebido. Dentre essas regiões, destacam-se as estruturas do sistema límbico, em especial o hipocampo e o córtex pré-frontal (FUCHS e FLUGGE, 2003; DEDOVIC *et al.*, 2009).

Dessa forma, foi destacado até o momento, nesta seção, que a ativação do eixo HPA em situações de estresse agudo é de extrema importância para o organismo, sendo considerado um mecanismo fisiológico. Entretanto, em algumas situações, como no estresse persistente e/ou com uma intensidade exagerada, podem ocorrer desregulação nos mecanismos de retroalimentação negativa, tornando o

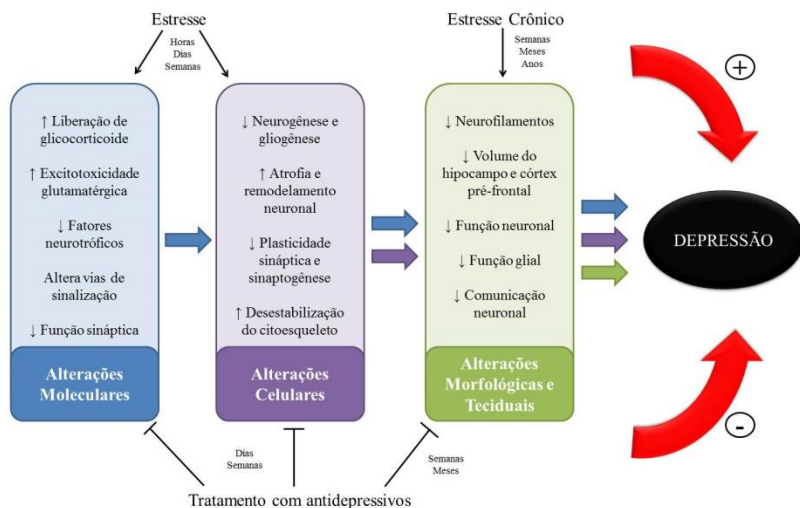
eixo HPA hiper-reativo, e, por consequência, trazendo prejuízos potenciais ao organismo devido ao excesso de glicocorticoides (HUETHER *et al.*, 1999).

Um dos transtornos psiquiátricos associadas com esse aumento de cortisol é a depressão. Essa relação é evidenciada pelos achados da literatura que demonstram que uma parcela significativa de pacientes com depressão têm níveis aumentados de cortisol (avaliado no cabelo, na urina, na saliva ou no sangue) (DEUSCHLE *et al.*, 1997; OTTE *et al.*, 2004; BHAGWAGAR, HAFIZI e COWEN, 2005; PARIANTE e LIGHTMAN, 2008; DETTENBORN *et al.*, 2012). Além disso, quando o tratamento com antidepressivos é bem sucedido, ocorre uma diminuição no nível sérico de cortisol (PIWOWARSKA *et al.*, 2012). Alguns dos modelos animais de depressão também sustentam essa associação entre estresse e depressão, demonstrando que situações de estresse, ou que alteram diretamente o eixo HPA, podem causar um comportamento tipo-depressivo nos animais. Dentre esses modelos, destaca-se o modelo de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona (ZHAO *et al.*, 2008; LUSSIER *et al.*, 2013), o modelo de depressão induzido por estresse crônico imprevisível (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; MORETTI *et al.*, 2012; FILHO *et al.*, 2015) e o modelo de estresse de contenção (POLESZAK *et al.*, 2006; BUDNI *et al.*, 2013). Entretanto, vale destacar que nem todos os pacientes com depressão tem aumento no nível de cortisol (YOUNG, CARLSON e BROWN, 2001; VYTHILINGAM *et al.*, 2004). Pesquisadores sugerem que na depressão atípica pode ocorrer uma alteração no eixo HPA de modo diferente da hiperativação que ocorre no paciente com depressão melancólica, há uma redução dos níveis séricos de cortisol (LAMERS *et al.*, 2013).

Como revisado por Duric e Duman (2013) e demonstrado na **Figura 6**, o estresse, de acordo com a intensidade ou duração, pode desencadear efeitos moleculares, celulares ou morfológicos/teciduais. Estresse de horas, dias ou semanas já ocasiona alterações moleculares e celulares. Dentre as alterações moleculares, destacam-se: aumento da liberação de glicocorticoides, aumento da excitotoxicidade glutamatérgica, diminuição de fatores neurotróficos e da função sináptica e alteração em vias de sinalização intracelular. Já as alterações celulares incluem: diminuição da neurogênese e gliogênese, aumento da atrofia e remodelamento neuronal, diminuição da plasticidade sináptica e sinaptogênese e aumento da desestabilização do citoesqueleto. Se o estresse é mais intenso e se prolonga por semanas, meses ou anos, as alterações podem progredir para modificações morfológicas e teciduais,

como: diminuição do volume do hipocampo e do córtex pré-frontal, diminuição dos neurofilamentos e da função neuronal e glial, bem como diminuição na comunicação neuronal. Todas essas alterações contribuem para o aparecimento de sintomas depressivos. Por outro lado, o tratamento com antidepressivos podem reverter essas alterações moleculares, celulares, morfológicas e na proliferação de neurônios hipocâmpais, melhorando os sintomas depressivos (DURIC e DUMAN, 2013).

Figura 6. Alterações ocasionadas pelo estresse

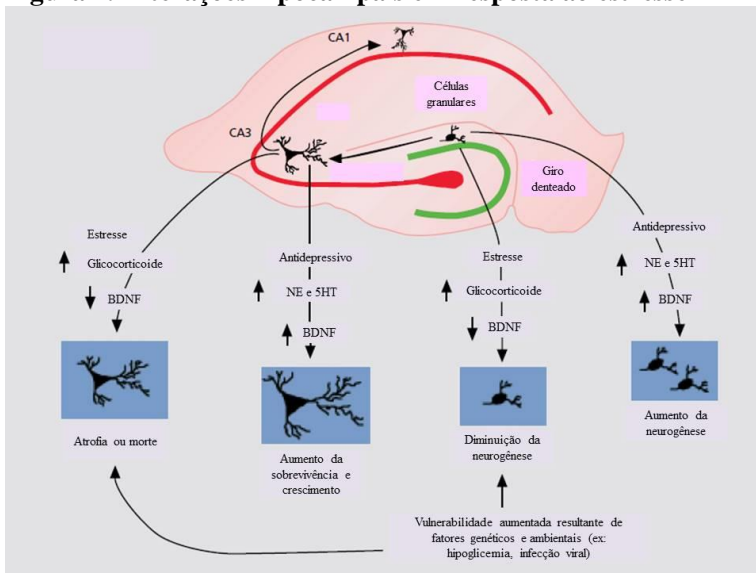


Legenda: O estresse de horas, dias ou semanas é capaz de ocasionar alterações moleculares (em azul) e celulares (em roxo). Quando o estresse se cronifica, essas alterações podem progredir para modificações estruturais (em verde) mais severas em neurônios e regiões cerebrais límbicas implicadas na depressão. Por outro lado, o tratamento com antidepressivos reverte os efeitos negativos do estresse, melhorando os sintomas da depressão. Adaptado de Duric e Duman (2013).

Devido as grandes concentrações de receptores para glicocorticoides no hipocampo, o estresse ocasiona efeitos significativos nessa região encefálica. Como revisado por Duman (2004a) e esquematizado na **Figura 7**, o estresse ocasiona, pelo menos, duas ações principais em duas regiões diferenciadas do hipocampo. O estresse prolongado causa atrofia ou remodelamento dos neurônios piramidais da

região CA3, diminuindo o número e/ou comprimento dos dendritos apicais. Além disso, o excesso de glicocorticoides ocasiona uma diminuição nos níveis de BDNF, o que também contribui para a atrofia das células piramidais. Já no giro dentado, o estresse prolongado e/ou excesso de glicocorticoide diminui a neurogênese. Parte desse efeito também é devido à diminuição do BDNF. Por outro lado, o uso crônico de antidepressivos aumenta os níveis de serotonina e norepinefrina, aumentando o BDNF e revertendo os efeitos do estresse/glicocorticoide tanto na região CA3 quanto no giro dentado (DUMAN, 2004a).

Figura 7. Alterações hipocâmpais em resposta ao estresse



Legenda: O estresse crônico ocasiona duas alterações principais em duas regiões específicas do hipocampo. Na região CA3, o estresse e/ou excesso de glicocorticoide causa atrofia ou remodelamento dos neurônios piramidais, diminuindo o número e/ou comprimento dos dendritos apicais e, parte desse efeito, é dependente da diminuição do BDNF. Já no giro dentado, o estresse prolongado e/ou excesso de glicocorticoide diminui a neurogênese e, parte desse efeito também é devido à diminuição do BDNF. Por outro lado, o uso crônico de antidepressivos aumenta os níveis de 5HT e NE, aumentando o BDNF e revertendo os efeitos do estresse/glicocorticoide tanto na região CA3 quanto no giro dentado. Abreviaturas: 5HT, serotonina; BDNF, fator

neurotrófico derivado do encéfalo; NE, norepinefrina. Fonte: adaptado de Duman (2004a).

Outros estudos de revisão corroboram o papel do estresse na fisiopatologia da depressão, demonstrando que situações de estresse estão associadas com diminuição do volume de regiões cerebrais, principalmente do hipocampo que, além de estar associado com a depressão, também possui uma elevada concentração de receptores para os glicocorticoides (MACQUEEN e FRODL, 2011; DUMAN, 2014a). Estudos pré-clínicos também evidenciaram que, em modelos que mimetizam situações de estresse, ocorreu uma diminuição na neurogênese no hipocampo (MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008; DAVID *et al.*, 2009), além de uma diminuição na proliferação e diferenciação de progenitores neurais e na sobrevivência de neurônios jovens (WONG e HERBERT, 2004). Além disso, o estresse crônico e excesso de cortisol também podem culminar no aumento na morte de neurônios (CROCHEMORE *et al.*, 2005; BACHIS *et al.*, 2008).

Ressalta-se que após animais serem submetidos a protocolos de estresse, alguns estudos reportam um aumento nas espécies reativas de oxigênio e na peroxidação lipídica, bem como alteração nos níveis de antioxidantes como a glutatona ou na atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase. Destaca-se que essas situações podem ser as responsáveis, pelo menos em parte, pelo comportamento tipo-depressivo induzido pelos protocolos de estresse (KUMAR, KUHAD e CHOPRA, 2011; MORETTI *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2014; FILHO *et al.*, 2015). O aumento de citocinas inflamatórias, que é outro fator correlacionado com a fisiopatologia da depressão, também é uma característica dos modelos animais de depressão induzido por estresse crônico (MUNHOZ *et al.*, 2006; GOSHEN *et al.*, 2008; FAROOQ *et al.*, 2012). Além disso, meta-análise também demonstra que humanos submetidos a estresse psicológico têm aumento de citocinas inflamatórias, principalmente interleucina-6 e interleucina-1 β (STEPTOE, HAMER e CHIDA, 2007).

O estresse também é capaz de prejudicar a neurotransmissão monoaminérgica, causando redução no número e na função de receptores serotoninérgicos no hipocampo (FLUGGE, 1995; VAN RIEL *et al.*, 2003; KIERAN, OU e IYO, 2010). Protocolos de estresse também diminuem os níveis hipocampais e corticais de BDNF (FILHO *et al.*, 2015), que, como já mencionado, está intimamente relacionado com a depressão. O estresse também pode aumentar os níveis de glutamato extracelular (CHARNEY e MANJI, 2004) ou alterar a neurotransmissão

glutamatérgica em regiões encefálicas como o córtex pré-frontal e hipocampo (POPOLI *et al.*, 2012). Corroborando esses achados, estudos já demonstraram que agonistas de receptores NMDA aumentaram a secreção de ACTH, efeito que foi prevenido pelo tratamento com antagonistas desses receptores (FARAH *et al.*, 1991; JEZOVA, OLIVER e JURCOVICOVA, 1991). Além disso, o uso de cetamina, um antagonista de receptores NMDA, regulou os níveis de cortisol e ACTH e preveniu a hipertrofia da glândula adrenal em animais submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado (GARCIA *et al.*, 2009). Dessa forma, observa-se que o estresse é capaz de influenciar diversos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão da depressão.

Embora o estresse desencadeie todas essas alterações que podem contribuir para o desenvolvimento ou progressão da depressão, vale destacar que o estresse *per se*, não necessariamente irá propiciar o aparecimento da depressão, já que a maioria dos indivíduos não se torna depressivo após passar por situações estressantes (NESTLER *et al.*, 2002). Como já mencionado, a ativação do eixo HPA frente a uma situação de estresse agudo é algo benéfico e necessário ao organismo. Entretanto, a intensificação do estresse pode aumentar o risco de depressão, embora seja necessário um conjunto de alterações para que ocorra o aparecimento de sintomas depressivos, reforçando a ideia de que esse transtorno de humor tem um caráter multifatorial e multifacetado (TSIGOS e CHROUSOS, 2002; DURIC e DUMAN, 2013).

Até agora foi demonstrado o papel de alguns neurotransmissores, da neurogênese e do estresse na fisiopatologia da depressão. Para que todos esses fatores contribuam para a piora ou melhora dos sintomas depressivos, são necessárias alterações de várias vias de sinalização intracelular (COYLE e DUMAN, 2003; DUMAN *et al.*, 2012). A seguir, será comentado sobre as vias mais correlacionadas com o presente trabalho.

1.1.6 Vias de sinalização intracelular envolvidas na depressão

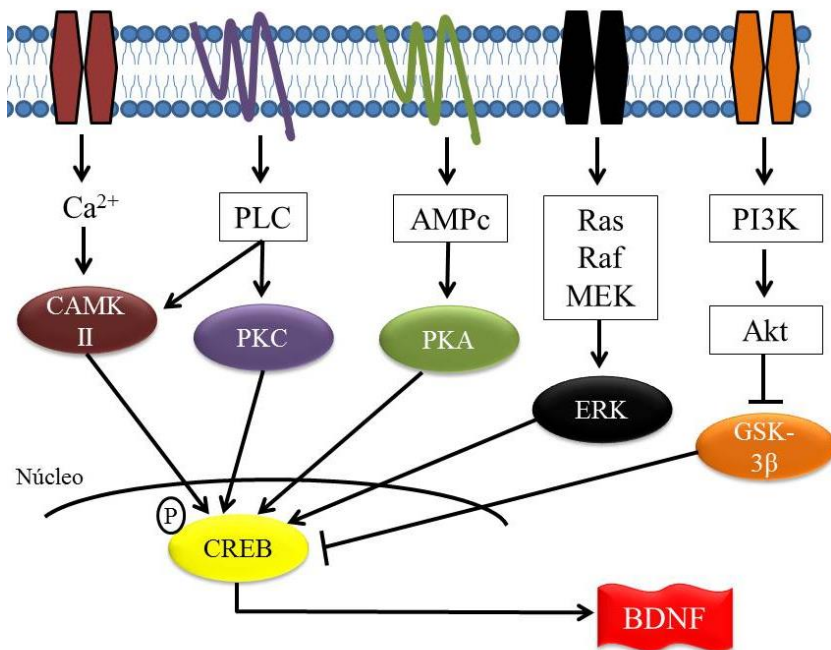
A investigação das vias de sinalização envolvidas na fisiopatologia e/ou no tratamento da depressão tem sido um alvo frequente das pesquisas científicas. Algumas das vias de sinalização mais estudadas são as vias de sinalização envolvidas na regulação do BDNF (tanto em relação à ativação quanto à resposta ocasionada por essa neurotrofina), bem como as vias estimuladas após a utilização de antidepressivos (HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004; MALBERG,

2004; TARDITO *et al.*, 2006; CUNHA, BRAMBILLA e THOMAS, 2010).

As vias de sinalização envolvidas com o BDNF já foram discutidas anteriormente no tópico da hipótese neurotrófica (item 1.1.2). Nesta seção serão discutidas as vias de sinalização envolvidas na resposta aos antidepressivos e/ou outros pontos da fisiopatologia da depressão que tem correlação com o presente estudo.

Como demonstrado na **Figura 8**, o uso de antidepressivos desencadeia mudanças em vias de sinalização intracelular que podem culminar, direta ou indiretamente, com a ativação do CREB e posterior aumento do BDNF. De acordo com o tipo de antidepressivo utilizado, pode ocorrer ativação da proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), CAMKII, proteína de ligação ao GTP (Ras) - proteína associada ao Ras (Raf) - ERK, Akt e inibição da glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β) (HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004; MALBERG, 2004; TARDITO *et al.*, 2006).

Figura 8. Vias de sinalização intracelular afetadas pelos antidepressivos e que culminam com a ativação do CREB e posterior aumento do BDNF



Legenda: Esquema mostrando que várias vias de sinalização, incluindo a CAMKII, PKC, PKA e ERK, ativadas por exemplo, pelo uso de antidepressivos, podem culminar com uma ativação do CREB. A inibição da GSK-3β também propicia a ativação do CREB (por impedir seu efeito inibitório sobre o CREB). O CREB ativado aumenta a expressão do BDNF. Abreviaturas: Akt, proteína cinase B; AMPc, 3,5'-monofosfato de adenosina cíclico; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; CAMKII, proteína cinase dependente de Ca²⁺/calmodulina; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; ERK, proteína cinase regulada por sinal extracelular; GSK-3β, glicogênio sintase cinase 3β; MEK, ERK cinase; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinase; PKA, proteína cinase A; PKC, proteína cinase C; PLC, fosfolipase C; Raf, fator associado ao Ras; Ras, proteína de ligação ao GTP. Fonte: adaptado de Hashimoto, Shimizu e Iyo (2004).

A PKA é ativada quando existe um aumento de AMPc, que é produzido pela ativação da adenilato ciclase (NAIR e VAIDYA, 2006). No SNC, a PKA possui inúmeras funções, incluindo um papel importante na plasticidade sináptica e no desenvolvimento neuronal (DAGDA e DAS BANERJEE, 2015). A PKA foi a primeira proteína que se descobriu ter a capacidade de fosforilar o CREB em resíduo de serina (Ser¹³³) (NAIR e VAIDYA, 2006). Uma diminuição na atividade da PKA já foi observada nos fibroblastos de pacientes com depressão melancólica (SHELTON *et al.*, 1999). Por outro lado, um aumento na atividade da PKA tem sido implicado na resposta antidepressiva de alguns tratamentos, incluindo fármacos monoaminérgicos ou antagonistas do receptor NMDA (ALMEIDA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2012; NICIU *et al.*, 2013). Também já foi demonstrado que o inibidor seletivo da recaptção da serotonina, sertralina aumentou a neurogênese hipocampal via mecanismo dependente da ativação da PKA (ANACKER *et al.*, 2011).

Outra via de sinalização importante é a da enzima PKC, que possui várias isoformas. Cada uma dessas isoformas funciona como transdutores de sinais nas células, permitindo regular um grande número de funções celulares, incluindo a diferenciação, proliferação, migração e apoptose celular, tornando-as alvos terapêuticos atrativos para uma série de doenças (VELAZQUEZ, MOHAMMAD e SWEITZER, 2007; STEINBERG, 2008). Todas as isoformas da PKC são encontradas no SNC e são importantes para a regulação do humor. Após ocorrer um aumento de íons cálcio intracelular e de diacilglicerol (produzidos pela ativação da fosfolipase C), a PKC é recrutada para a membrana celular e muda sua conformação, permitindo a ligação com o substrato e posterior fosforilação. Dentre os diversos alvos que a PKC pode fosforilar, destaca-se o CREB (ABRIAL *et al.*, 2011). Estudos pós-morte com adolescentes vítimas de suicídio demonstraram uma diminuição da atividade da PKC no hipocampo e no córtex pré-frontal desses pacientes (PANDEY *et al.*, 1997; PANDEY *et al.*, 2004). Em modelos animais de depressão também já foi evidenciado uma diminuição na expressão ou na atividade da PKC no hipocampo e/ou córtex frontal desses animais (DWIVEDI *et al.*, 2005; MORIGUCHI *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2007; HAN *et al.*, 2008). Por outro lado, foi demonstrado que o efeito tipo-antidepressiva de alguns compostos, tais como ácido ferúlico e creatina, depende da ativação da PKC (ZENI *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014).

O aumento de íons cálcio intracelular também pode ativar a CAMKII. Dentre as funções da CAMKII no SNC, destaca-se seu papel na plasticidade, aprendizagem, consolidação da memória, bem como na

fisiopatologia e tratamento dos transtornos de humor (DU *et al.*, 2004; ROBISON, 2014). Em humanos com depressão já foi evidenciado uma diminuição na expressão da CAMKII α no córtex pré-frontal (XING *et al.*, 2002). CAMKII também tem sido reportada como alvo para fármacos antidepressivos. O tratamento crônico com antidepressivos como a desipramina (antidepressivo tricíclico) e com a reboxetina (inibidor da recaptção de norepinefrina) aumenta a autofosforilação e a atividade da CAMKII (TIRABOSCHI *et al.*, 2004). Inibidores da CAMKII, por sua vez, impedem o efeito tipo-antidepressivo de vários compostos, como por exemplo, menantina, ácido ferúlico e creatina (ALMEIDA *et al.*, 2006; ZENI *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014). Por outro lado, já foi evidenciando que o tratamento crônico com fluoxetina diminui a expressão da CAMKII α no núcleo accumbens (ROBISON *et al.*, 2014), sugerindo que a função da CAMKII na depressão e na ação antidepressiva pode variar de acordo com a região encefálica envolvida (ROBISON, 2014).

As proteínas envolvidas na via das MAPKs também têm sido bastante estudadas quanto ao seu papel na depressão. Entre as MAPKs, a ERK1 e ERK2 estão entre as mais bem caracterizadas, estando envolvidas na regulação da apoptose, crescimento e diferenciação celular, neuroplasticidade, além de modular a resposta ao estresse químico e físico (CHANG e KARIN, 2001; JOHNSON e LAPADAT, 2002). Estudo pós-morte em pacientes com depressão demonstrou que o hipocampo desses pacientes tinham níveis elevados de um regulador negativo da MAPK, MAPK fosfatase 1 (DURIC *et al.*, 2010). Adicionalmente, outros estudos pós-morte em pacientes com depressão e que cometeram suicídio demonstraram que várias proteínas da via da MAPK, incluindo MEK1/2 e ERK1/2, estavam diminuídas no hipocampo e/ou córtex pré-frontal (DWIVEDI *et al.*, 2001; YUAN *et al.*, 2010). Corroborando a importância da via da MAPK na depressão, já foi evidenciado que, em animais, o uso de um inibidor da MEK desencadeia efeito tipo-depressivo e impede as ações de antidepressivos como a desipramina, sertralina ou cetamina (DUMAN *et al.*, 2007; REUS *et al.*, 2014). Além disso, animais submetidos a um modelo de depressão induzido pela corticosterona apresentaram uma diminuição da fosforilação da ERK1/2 no giro denteado (GOURLEY *et al.*, 2008). Estresse por 21 dias também diminuiu a fosforilação da ERK2 e o imunoc conteúdo da ERK1/2 no hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos, efeitos que foram revertidos pelo tratamento com a fluoxetina (QI *et al.*, 2008). Adicionalmente, o aumento da imunomarcção hipocampal da ERK fosforilada também parece estar implicado no

efeito tipo-antidepressivo causado pela administração intra-hipocampal de BDNF em ratos (SHIRAYAMA *et al.*, 2002).

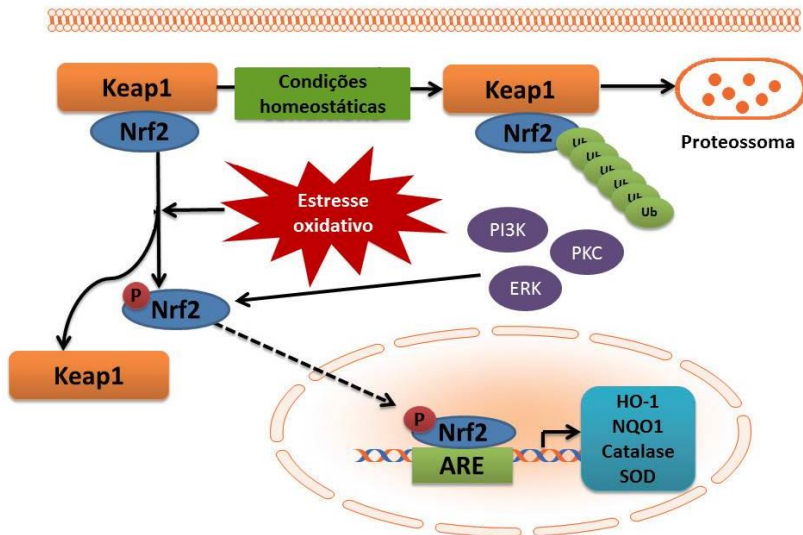
Vários estudos indicam que o uso de inibidores da GSK-3 β podem ser interessantes para o tratamento da depressão (BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009; MAES *et al.*, 2012). Inicialmente, a GSK-3 foi identificada como uma enzima que participa da regulação do metabolismo do glicogênio (COHEN, 1979). Hoje, se sabe que essa proteína está envolvida na regulação de vários outros processos celulares, incluindo apoptose e sobrevivência celular, plasticidade sináptica e transcrição de genes (JOPE, 2003; BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009). Existem duas isoformas da GSK (α e β), que são ativadas por fosforilação em resíduos de tirosina e inativadas por fosforilação em resíduos de serina. A GSK-3 β , a isoforma de interesse no presente trabalho, é ativada quando ocorre fosforilação no resíduo de tirosina 216 e inativada quando a fosforilação ocorre no resíduo de serina 9. Vale destacar que várias proteínas cinases podem fosforilar a GSK-3 β em resíduos de serina, incluindo a Akt, PKA e PKC (JOPE e JOHNSON, 2004; CORTES-VIEYRA *et al.*, 2012).

A ativação da PI3K, que catalisa a produção de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, induz a ativação da Akt (CANTLEY, 2002). A ativação desta enzima, por sua vez, pode propiciar a fosforilação no resíduo de serina 9 da GSK-3 β , deixando-a inativa (BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009). Anormalidades na via da PI3K/Akt/GSK-3 β tem sido implicadas nos transtornos de humor. A inibição da GSK-3 β , por exemplo, tem sido associada com efeitos antidepressivos (GOULD *et al.*, 2004; BEAULIEU *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2008). Corroborando esses dados, antidepressivos como fluoxetina e imipramina aumentam a fosforilação em resíduo de serina 9 da GSK-3 β (LI *et al.*, 2004). Adicionalmente, inibidores da GSK-3 β possuem efeito sinérgico com compostos tipo-antidepressivos como o ácido fólico e ácido ascórbico (BUDNI *et al.*, 2011; MORETTI *et al.*, 2013). Em humanos, a atividade da GSK-3 β parece ser dependente da idade. Em pacientes adultos depressivos foi demonstrado que a atividade da GSK-3 β no córtex pré-frontal estava aumentada (KAREGE *et al.*, 2007) ou inalterada (PANDEY *et al.*, 2009). Por outro lado, em pacientes adolescentes vítimas de suicídio, a atividade da GSK-3 β no córtex pré-frontal estava diminuída (PANDEY *et al.*, 2009).

Alteração na via do Nrf2/heme oxigenase-1 (HO-1) também tem sido associada com a depressão (MAES *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013; MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). O Nrf2 é um fator de transcrição que induz a expressão de uma variedade de genes

citoprotetores e de detoxificação (CALKINS *et al.*, 2009). Dentre as diversas funções do Nrf2, destaca-se seu papel na regulação das defesas antioxidantes celulares e das respostas celulares ao estresse, auxiliando na homeostasia redox do encéfalo e protegendo os neurônios contra a morte celular (JOHNSON *et al.*, 2008). Como demonstrado na **Figura 9**, em condições basais, o Nrf2 encontra-se no citoplasma, associado à proteína repressora Keap1 (*Kelch-like-ECH-associated protein 1*), tornando o Nrf2 inativo e estimulando sua degradação proteossomal. Entretanto, com a ativação de algumas cinases, como a PI3K/Akt, PKC e ERK, pode ocorrer a fosforilação do Nrf2 em resíduos de serina ou treonina, induzindo sua dissociação da Keap1 e posterior translocação nuclear do Nrf2. No núcleo, o Nrf2 se liga ao ARE, aumentando a transcrição de genes que codificam enzimas da fase II de detoxificação e/ou enzimas antioxidantes como a HO-1, NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO1), catalase, superóxido dismutase (SOD), entre outras (SURH, 2003; TURPAEV, 2013; CHEN, ZHANG e CAI, 2014; NITURE, KHATRI e JAISWAL, 2014).

Figura 9. Ativação do fator de transcrição Nrf2



Legenda: No citoplasma, em condições normais, o Nrf2 está ligado à proteína Keap1. Essa associação promove a inativação do Nrf2, bem como sua ubiquitinação e subsequente degradação através da via proteossomal. Em situações como no estresse oxidativo ou na ativação da PI3K, PKC ou ERK ocorre uma dissociação do complexo Nrf2-Keap1, fosforilação do Nrf2 e translocação nuclear. No núcleo, Nrf2 se liga ao ARE, aumentando a transcrição de genes da HO-1, NQO1, catalase e SOD. Abreviaturas: ARE, elemento de resposta a antioxidantes; ERK, proteína cinase regulada por sinal extracelular; HO-1, heme oxigenase-1; Keap1, *Kelch-like-ECH-associated protein 1*; NQO1, NAD(P)H: quinona oxidoredutase 1; Nrf2, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinase; PKC, proteína cinase C; SOD, superóxido dismutase; Ub, ubiquitinação. Fonte: adaptado de Chen, Zhang e Cai (2014).

Dentre as proteínas associadas à ativação do Nrf2, destaca-se a HO-1. A HO-1 é a forma induzível da HO, enquanto que a HO-2 é a forma constitutiva (KIKUCHI, YOSHIDA e NOGUCHI, 2005). A HO-1 é uma proteína de 32 kDa que degrada o heme à biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono em vários tecidos, incluindo o encéfalo. Em resposta a um desafio oxidativo, a indução da HO-1 protege a célula por promover o catabolismo de metaloporfirinas pró-oxidantes, tais como o

heme, para pigmentos da bile (biliverdina e bilirrubina) com capacidade de sequestrar radicais livres. Por outro lado, o ferro livre e o monóxido de carbono, na presença de desbalanço oxidativo, podem exacerbar o estresse oxidativo e causar danos nas membranas das mitocôndrias (SCHIPPER, 2000; 2004; RYTER e CHOI, 2015). Na tentativa de se evitar isso, normalmente também ocorre uma indução da apoferritina, que é a principal ferro-oxidase e proteína de ligação ao ferro que impedirá a toxicidade do excesso do ferro (RYTER e TYRRELL, 2000; SCHIPPER e SONG, 2015). Vale destacar que, no encéfalo normal, a expressão da HO-1 é muito baixa, sendo expressa apenas em alguns neurônios ou células gliais (BARANANO e SNYDER, 2001). Em contrapartida, na presença de um insulto/injúria (ex: estresse oxidativo), a expressão da HO-1 é induzida principalmente na microglia, embora neurônios e astrócitos também possam ter imunorreatividade para a HO-1 (LU e ONG, 2001; MUNOZ *et al.*, 2005; SCHIPPER e SONG, 2015).

Em relação à via do Nrf2/HO-1 e a depressão, já foi demonstrado que a deleção do Nrf2 em camundongos ocasionou um comportamento tipo-depressivo, reduziu os níveis de dopamina e serotonina e aumentou os níveis de glutamato no córtex pré-frontal desses animais (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). Outro estudo também evidenciou que camundongos com deleção para Nrf2, não tinham o efeito tipo-antidepressivo induzido pela agmatina (FREITAS *et al.*, 2015). Recentemente, também foi demonstrado que o modelo de depressão induzido pela administração de corticosterona diminuiu o Nrf2 no córtex e no hipocampo e que o tratamento com a fluoxetina reverteu essa alteração (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2015). De maneira interessante, a inibição da HO-1 também impediu o efeito tipo-antidepressivo do ácido ascórbico e da creatina, enquanto que a coadministração de doses subefetivas de ácido ascórbico ou creatina com um indutor da HO-1 propiciou um efeito tipo-antidepressivo sinérgico (MORETTI *et al.*, 2013; CUNHA *et al.*, 2015). Corroborando esses achados, foi observada uma diminuição nos níveis de HO-1 no soro de pacientes depressivos (RYBKA *et al.*, 2013).

Com base no exposto até o momento, nota-se que a depressão é uma doença multifacetada, com diversos mecanismos fisiopatológicos envolvidos. Na tentativa de melhor entender sobre esse transtorno de humor, bem como descobrir estratégias para melhorar o tratamento, modelos animais de depressão são de grande valia.

1.2 MODELOS ANIMAIS DE DEPRESSÃO

A utilização de modelos animais é uma estratégia interessante para identificar novos compostos com possível ação antidepressiva, bem como para possibilitar uma melhor compreensão das bases neurobiológicas envolvidas na depressão (CRYAN, MARKOU e LUCKI, 2002). Os modelos animais podem auxiliar tanto no desenvolvimento de hipóteses que expliquem a fisiopatologia da depressão, quanto no melhor entendimento das ações dos antidepressivos ou descoberta de novos medicamentos/compostos que possam ser úteis para tratar esse transtorno de humor (MCARTHUR e BORSINI, 2006). Entretanto, alguns dos principais sintomas da depressão em humanos, como humor deprimido, sentimento de culpa e ideação suicida, são de difícil mensuração em animais de laboratório, tornando-se difícil a validação de um modelo que abranja todas as características (sintomas e bases fisiopatológicas) da depressão (NESTLER *et al.*, 2002; CRYAN e SLATTERY, 2007).

Os modelos animais podem ter três tipos de validades diferentes: 1) validade preditiva (ou farmacológica): significa que o modelo responde aos tratamentos de uma forma que prevê os efeitos desses tratamentos em seres humanos (NESTLER e HYMAN, 2010); 2) validade de face: indica que o modelo reproduz características do tratamento e aspectos dos sintomas do paciente; 3) validade de constructo: envolve similaridades na fisiopatologia da doença. Essa validade pode ser alcançada através da exposição de um animal a um fator de risco ambiental ou a um fator genético bem validado. Além disso, a validade de constructo envolve similaridades anatômicas, bioquímicas, neuropatológicas ou comportamentais importantes da doença no ser humano (BELZUNG e LEMOINE, 2011).

Os modelos com validade preditiva, como o teste do nado forçado (TNF) e o teste de suspensão pela cauda (TSC), são amplamente utilizados para investigar novos fármacos ou substâncias com possível ação tipo-antidepressiva, bem como avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na fisiopatologia ou tratamento da depressão (NESTLER *et al.*, 2002; MCARTHUR e BORSINI, 2006; NESTLER e HYMAN, 2010). Porsolt, Bertin e Jalfre (1977) foram os primeiros pesquisadores que descreveram o TNF em ratos, que posteriormente foi utilizado para camundongos (PORSOLT, BERTIN e JALFRE, 1977; SCHECHTER e CHANCE, 1979). Já o TSC foi descrito em camundongos por Steru *et al.* (1985). Esses dois modelos baseiam-se na observação do animal após o mesmo ser exposto a uma situação inescapável. No início do teste, na tentativa de escapar da situação

aversiva, os animais tendem a se movimentar com mais frequência. Decorridos alguns minutos do teste, os animais tendem a desenvolver uma postura mais imóvel, que pode ser revertida pelo tratamento agudo com antidepressivos clássicos. Dessa forma, esses testes permitem a busca por compostos com possível ação tipo-antidepressiva (BOURIN, MASSE e HASCOET, 2005), e tem o benefício de serem de fácil uso e de boa reprodutibilidade (CRYAN, MARKOU e LUCKI, 2002).

Vale destacar que, embora o TNF e TSC tenham objetivos e validades similares, eles apresentam algumas diferenças. Enquanto que no TSC o camundongo é exposto ao estresse hemodinâmico de ser pendurado de forma incontrolável pela sua cauda, no TNF o animal é colocado em um cilindro cheio de água, o que se acredita ser uma situação mais aversiva para esse tipo de animal (THIERRY *et al.*, 1986). Além disso, como revisado por Cryan, Mombereau e Vassout (2005), o TSC possui alguns benefícios em relação ao TNF, entre eles: a) evita qualquer possibilidade de indução de hipotermia; b) não depende de coordenação motora para nadar; c) o tempo inicial para o animal desenvolver uma postura mais imóvel é mais curto; d) acredita-se que o TSC apresente uma maior sensibilidade farmacológica quando comparado ao TNF.

Outra estratégia interessante para estudos pré-clínicos na área da depressão é o uso de modelos animais com validade de constructo e de face. Dentre esses modelos, destacam-se os modelos baseados na exposição do animal a situações que são consideradas estressantes, principalmente o estresse crônico moderado e/ou imprevisível (MCARTHUR e BORSINI, 2006). Esses modelos de estresse crônico surgiram com o objetivo de tentar mimetizar o desenvolvimento da depressão em humanos (WILLNER, 1997). Os estudos usando esse tipo de modelo demonstram que ele apresenta uma boa validade preditiva, validade de face e validade de constructo (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; WILLNER, 1997; 2005). A validade preditiva é demonstrada pelo aumento no tempo de imobilidade nos TNF e TSC após os animais terem sido estressados, sugerindo um efeito tipo-depressivo, que é prevenido após o uso de antidepressivos usados na clínica ou por substâncias com potencial tipo-antidepressivo (LU *et al.*, 2006; KUMAR, KUHAD e CHOPRA, 2011; MORETTI *et al.*, 2012). A validade de face é sugerida pelo fato de que esses protocolos diminuem o consumo de soluções doces palatáveis, bem como o comportamento de autocuidado, sintomas que são comparados à anedonia presente nos humanos (WILLNER *et al.*, 1987; LU *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2009; ISINGRINI *et al.*, 2010). Além disso, os modelos com indução de

estresse também propiciam alterações fisiopatológicas que são observadas em humanos, como a diminuição do BDNF e do fator de crescimento do nervo (LIU *et al.*, 2014; FILHO *et al.*, 2015), aumento de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2015) e aumento de corticosterona (DETANICO *et al.*, 2009; ABDUL AZIZ, KENDALL e PARDON, 2012), além de ser desencadeado por uma situação (estresse) que também está envolvida no desencadeamento da depressão em humanos (NESTLER e HYMAN, 2010). Dessa forma, esses modelos de estresse proporcionam uma validade de constructo (BELZUNG e LEMOINE, 2011).

1.3 ZINCO

Diversas estratégias nutricionais objetivando a melhora da depressão têm sido estudadas, com um grande destaque para o zinco (MANOSSO, MORETTI e RODRIGUES, 2013; NOWAK, 2015). O zinco é definido como um micronutriente ou elemento traço essencial, sendo importante para o crescimento e reprodução normais de plantas, animais e humanos (PARKIN, 2004; FRASSINETTI *et al.*, 2006). Entre os anos de 1960-1980, estudos começaram a evidenciar a deficiência de zinco em humanos e, que essa deficiência, ocasionava um prejuízo no crescimento e hipogonadismo em homens (PRASAD, HALSTED e NADIMI, 1961; HAMBIDGE, 1981; O'DELL, 1984; PRASAD, 1984). Desde então, diversos estudos já foram realizados confirmando a essencialidade do zinco, bem como a importância da sua suplementação (SALGUEIRO *et al.*, 2000a; PRASAD, 2012). Hoje, já é bem estabelecido que o zinco é o segundo elemento traço mais prevalente no corpo humano, ficando atrás apenas do ferro (PAOLETTI *et al.*, 2009).

O zinco (que em condições fisiológicas é encontrado apenas como cátion divalente – Zn^{2+}) possui inúmeras funções ao organismo, incluindo funções estruturais, enzimáticas e reguladoras/mediadoras de sinalização (KAMBE *et al.*, 2015). Esse mineral é necessário para a atividade e/ou manutenção estrutural de mais de 300 enzimas do corpo humano. Entre elas, estão enzimas da classe das oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (PARKIN, 2004). Além disso, o papel do zinco no metabolismo dos ácidos nucleicos já é bem estabelecido desde o século passado (WU e WU, 1987). Quase metade de todos os fatores de transcrição conhecidos é da superfamília “*C₂H₂ zinc finger*”, em português chamada de dedo de zinco. Essas proteínas dedo de zinco possuem um domínio N-terminal (que se liga a outras proteínas) e um domínio C-terminal, constituído do *C₂H₂* dedo de zinco (que se liga ao DNA), sendo o zinco muito importante para manter

a estrutura e, por conseguinte, a funcionalidade dessas proteínas (EMERSON e THOMAS, 2009).

O zinco também é importante para a função imunológica, possuindo múltiplos efeitos no sistema imunológico, sendo que sua deficiência aumenta a susceptibilidade a vários patógenos, além de piorar o processo de cicatrização (SHANKAR e PRASAD, 1998; PRASAD, 2012). Além disso, vários estudos clínicos enfatizam que zinco possui efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, ao passo que a sua deficiência é capaz de ocasionar aumento de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo nos indivíduos (TAPIERO e TEW, 2003; PRASAD *et al.*, 2004; PRASAD, 2008; DE OLIVEIRA KDE *et al.*, 2009; BAO *et al.*, 2010; PRASAD, 2014). O zinco também tem funções na reprodução, gestação e lactação, no metabolismo da insulina, na divisão celular e no metabolismo de outros nutrientes, como por exemplo, da vitamina A (SALGUEIRO *et al.*, 2000a). Esse mineral também é importante para o SNC, o que será explanado mais adiante.

Dentre os indicadores para avaliar o estado nutricional de zinco no organismo, destacam-se o zinco sérico/plasmático e zinco eritrocitário. Entretanto, outros indicadores também podem ser utilizados, como a concentração do zinco no cabelo, no neutrófilo ou no linfócito, bem como a dosagem da metalotioneína plasmática ou eritrocitária. Vale destacar que as metalotioneínas são proteínas encontradas no citosol das células eucarióticas e que estão relacionadas com o controle da concentração de elementos traços livres como o zinco e o cobre, com o sequestro de metais para proteção contra estresse oxidativo e para detoxificação dos mesmos, além de ter papel no transporte de íons metálicos para outras proteínas (SALGUEIRO *et al.*, 2000a).

Segundo a estimativa da prevalência global de deficiência de zinco, 17,3% da população mundial possui uma ingestão inadequada de zinco (WESSELLS e BROWN, 2012). A deficiência de zinco pode ser ocasionada devido a uma variedade de condições, incluindo fatores alimentares, síndrome de má absorção, doença hepática alcoólica, doença renal crônica, doença falciforme, queimadura extensa, condições debilitantes crônicas, entre outras. Dentre as manifestações de uma deficiência moderada de zinco incluem retardo do crescimento e hipogonadismo masculino nos adolescentes, pele áspera, falta de apetite, letargia mental, cicatrização retardada, doenças imunológicas e alterações neuro-sensoriais (PRASAD, 2012). Embora a deficiência de zinco seja muito mais comum, em alguns casos pode ocorrer toxicidade desse metal (dificilmente ocasionada apenas por meio da alimentação).

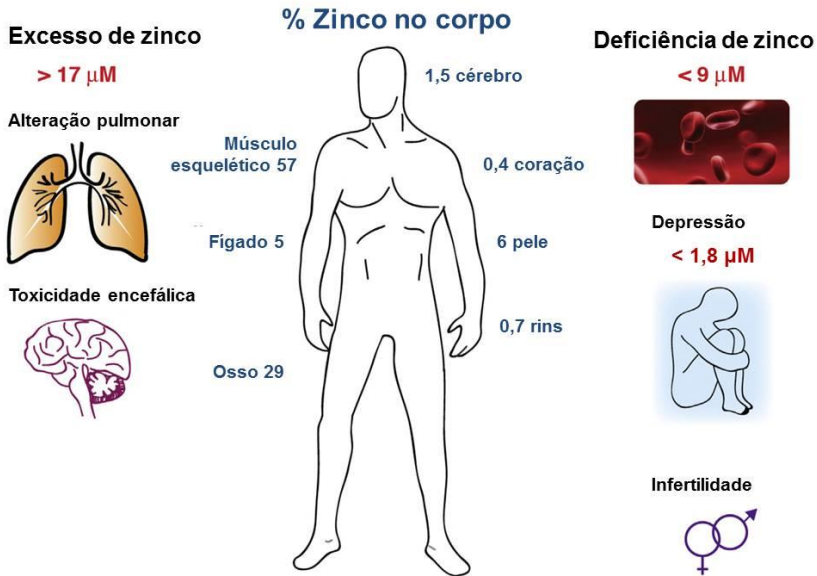
Os sinais e sintomas que uma elevada concentração de zinco pode provocar são: taquicardia, choque vascular, náuseas, vômitos, diarreia e danos no pâncreas e no parênquima hepático, além de poder afetar o metabolismo de outros nutrientes, como do cobre (SALGUEIRO *et al.*, 2000b).

1.3.1 Absorção e metabolismo do zinco

As principais fontes alimentares de zinco são ostras, carnes (principalmente vermelha), fígado, ovo, oleaginosas, gergelim, alguns cereais e leite e derivados (MURPHY, WILLIS e WATT, 1975; HAEFLEIN e RASMUSSEN, 1977; SALGUEIRO *et al.*, 2000b). Entretanto, constituintes da dieta podem influenciar a absorção do zinco presente nesses alimentos. O fator que mais influencia na absorção do zinco é o fitato, encontrado principalmente em cereais integrais, como arroz e milho, que ocasiona uma diminuição na absorção do zinco. Por outro lado, o conteúdo de proteína na refeição (principalmente quando têm os aminoácidos glicina, histidina, lisina, cisteína e metionina) é associado, positivamente, com a absorção do zinco (LONNERDAL, 2000; SALGUEIRO *et al.*, 2000b).

Como demonstrado na **Figura 10**, a distribuição do zinco no organismo ocorre da seguinte maneira: quase 60% do zinco é armazenado no músculo esquelético. Em seguida, os ossos possuem quase 30% de todo o zinco do organismo. Pele, fígado e encéfalo possuem 6%, 5% e 1,5% respectivamente. Rins, coração, cabelo e plasma possuem menos de 1% do zinco do organismo. Já o zinco sérico representa apenas 0,1% de todo o zinco do organismo (KING, SHAMES e WOODHOUSE, 2000; KAMBE *et al.*, 2015). Em sujeitos saudáveis, os valores sanguíneos de zinco variam entre 9 e 17 μM . Abaixo de 9 μM é considerado deficiência de zinco e pode estar associado com infertilidade e depressão (quando os níveis estão abaixo de 1,8 μM). Acima de 17 μM pode ocorrer toxicidade, podendo causar problemas nos pulmões e toxicidade no encéfalo (MARGER, SCHUBERT e BERTRAND, 2014). Ressalta-se que a maior parte do zinco está localizada intracelularmente, sendo que 10% está localizado nas membranas, 30 - 40% localizado no núcleo e 50% no citoplasma, organelas (ex: mitocôndria, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi) ou vesículas especializadas que estocam hormônios (ex: insulina, hormônio do crescimento), neurotransmissores (ex: glutamato) ou enzimas digestivas (TAPIERO e TEW, 2003; PETKOVIC, MILETTA e MULLIS, 2012; KAMBE *et al.*, 2015).

Figura 10. Distribuição do zinco no organismo humano



Legenda: Esquema mostrando a distribuição do zinco no organismo humano. A deficiência de zinco pode causar diversos problemas, incluindo infertilidade e depressão. Por outro lado, o excesso de zinco (ex: através da inalação de fumaça contendo zinco) pode ocasionar problemas pulmonares e toxicidade encefálica. Fonte: adaptado de Marger, Schubert e Bertrand (2014).

Em mamíferos, o zinco pode ser absorvido no intestino delgado (duodeno ou jejuno) através de dois mecanismos: transporte ativo ou transporte passivo. O transporte ativo é saturável quando o zinco está em altas concentrações no lúmen intestinal. Por outro lado, sua eficácia aumenta quando o zinco está em baixas concentrações. Já o transporte passivo é um mecanismo de difusão, sendo sua eficácia proporcional à concentração do zinco, ou seja, quanto mais zinco, maior é a absorção desse mineral para o enterócito. Dessa forma, diferente do transporte ativo, o transporte passivo não aumenta sua eficácia em situações de baixas concentrações de zinco. Vale destacar que também existe uma secreção de zinco endógeno no intestino. Esse zinco é proveniente das secreções pancreática, biliar e intestinal ou da descamação das células da mucosa intestinal. Devido a esse motivo, a taxa de absorção do zinco

é difícil de ser determinada. Estima-se que a absorção intestinal do zinco varie de 15-40% (média de 33%) e, o que não é absorvido, é eliminado pelas fezes (SALGUEIRO *et al.*, 2000b; ROOHANI *et al.*, 2013). Por outro lado, o zinco administrado em solução aquosa em indivíduos em jejum, tem sua taxa de absorção em torno de 60-70% (ROOHANI *et al.*, 2013). Digno de nota, em situações de baixa ingestão de zinco, o organismo é regulado para absorver mais zinco e diminuir a secreção de zinco endógeno (SALGUEIRO *et al.*, 2000b).

Uma vez que o zinco é absorvido, ele pode se ligar a metalotioneínas intestinais ou ir do enterócito para o sangue (SALGUEIRO *et al.*, 2000b). Quando o zinco vai para a circulação sanguínea ele é transportado com auxílio de componentes plasmáticos como a albumina. Sua concentração no plasma é de 15 μM , dos quais 84% estão ligados à albumina, 15% à $\alpha 2$ -macroglobulina e 1% a aminoácidos livres. Quando o zinco chega ao fígado, ele tem a capacidade de se ligar a metalotioneínas, que são as principais proteínas envolvidas no metabolismo do zinco. Cada metalotioneína pode se ligar a sete íons de zinco, embora também possua alta afinidade pelo cobre. Além de serem induzidas por esses minerais essenciais, metais tóxicos como o cádmio, mercúrio e cobalto podem induzir a síntese das metalotioneínas. Existem pelo menos 12 isoformas de metalotioneínas identificadas em humanos, embora as isoformas 1, 2, 3 e 4 sejam as principais (TAPIERO e TEW, 2003). As isoformas 1 e 2 das metalotioneínas são amplamente expressas pelo corpo, tendo quantidades significativas no fígado, intestino, pâncreas e rins. A metalotioneína-3 é expressa especificamente no encéfalo, principalmente em neurônios do hipocampo, amígdala e córtex cerebral. Já a isoforma 4 é encontrada principalmente no epitélio de células escamosas (SALGUEIRO *et al.*, 2000b; KING, 2011; SHARMA e EBADI, 2014). Fatores como dieta rica em zinco, glicocorticoides, estresse e citocinas inflamatórias como interleucina-1 e interleucina-6 podem induzir a expressão das metalotioneínas (principalmente das isoformas 1 e 2). Vale destacar que as metalotioneínas têm funções importantes na destoxificação de metais pesados/traços, eliminação indireta de radicais livres, redistribuição de zinco em situação de estresse ou infecção aguda. A metalotioneína hepática também possui função de reservatório do zinco (SALGUEIRO *et al.*, 2000b; SHARMA e EBADI, 2014).

Os transportadores de zinco (ZnT) e a família de proteínas de importação do zinco (Zip) são famílias de transportadores de zinco nos mamíferos que são importantes para o metabolismo do zinco a nível

intracelular. Existem pelos menos 10 ZnT (normalmente com seis domínios transmembrana) e 15 Zip (normalmente com oito domínios transmembrana) diferentes encontradas em células humanas. ZnT e Zip parecem ter efeitos opostos na homeostase celular do zinco. Enquanto que ZnT reduz o zinco intracelular por promover o efluxo desse metal para vesículas intracelulares, os transportadores Zip aumentam o zinco intracelular por promover a captação extracelular do zinco e, possivelmente, por liberar o zinco das vesículas para o citosol da célula. ZnT1 é amplamente expresso no corpo (incluindo o encéfalo) e possui função de exportador de zinco. ZnT2 é expresso principalmente no intestino, rins, testículos e encéfalo e, além de ter função de exportador, também é importante para a compartimentalização do zinco em vesículas intracelulares. ZnT3 é expresso, em maior quantidade, no encéfalo, sendo importante para a regulação do zinco no SNC. ZnT4 é expresso nas glândulas mamárias e no encéfalo. ZnT5 é amplamente expresso no pâncreas, ovário, próstata e testículos, mas também pode ser encontrado no encéfalo. Já o ZnT6 é encontrado principalmente no fígado, encéfalo e intestino delgado. Os transportadores Zip também são importantes para o metabolismo de zinco intracelular em tecidos periféricos e no encéfalo, entretanto, não se tem bem definido qual isoforma é encontrada no encéfalo (LIUZZI e COUSINS, 2004; COUSINS, LIUZZI e LICHTEN, 2006; SENSI *et al.*, 2009).

A principal forma de eliminação do zinco ocorre pelo trato gastrointestinal. Estima-se que a quantidade de zinco eliminada via gastrointestinal é de 2,5-5,5 mg/d (TAPIERO e TEW, 2003). Entretanto, também pode ocorrer eliminação renal desse mineral, embora essa eliminação sofra um declínio em situações de ingestão baixa de zinco. Perdas adicionais do zinco também podem ocorrer através do suor, emissões seminais e perdas menstruais (KING, SHAMES e WOODHOUSE, 2000; ROOHANI *et al.*, 2013).

1.3.2 Zinco no SNC

O zinco pode entrar no SNC através da barreira hematoencefálica. O zinco pode ser captado para as células gliais ou por alguns neurônios (podendo ir tanto para o corpo celular quanto para o terminal axonal). No SNC, o zinco está na forma iônica (Zn^{2+}), sendo cerca de 90% estocado nas metaloproteínas. Os outros 10% são considerados zinco histoquimicamente reativo, que engloba o zinco livre e o zinco presente em vesículas de neurônios pré-sinápticos (TAKEDA, 2000; GOWER-WINTER e LEVENSON, 2012). Em neurônios, o zinco histoquimicamente reativo está presente principalmente em vesículas

pré-sinápticas de neurônios glutamatérgicos (FRANCO-PONS *et al.*, 2000), embora também já tenha sido identificada a sua colocação com neurônios contendo GABA na medula espinhal de ratos (WANG *et al.*, 2001). É interessante notar que um estudo pré-clínico já demonstrou que a homeostase encefálica do zinco é afetada por dieta deficiente em zinco (TAKEDA *et al.*, 2001), evidenciando a importância da ingestão adequada desse mineral para que ele consiga exercer suas funções no SNC.

Como já mencionado, o zinco histoquimicamente reativo é encontrado, principalmente, em vesículas pré-sinápticas contendo glutamato. Esses neurônios que liberam zinco e glutamato são chamados de neurônios gluzinérgicos. Os corpos celulares dos neurônios gluzinérgicos encontram-se principalmente no córtex cerebral e em estruturas límbicas como a amígdala. As fibras eferentes desses neurônios se direcionam, quase exclusivamente, para o córtex cerebral, amígdala, estriado ou estruturas límbicas como o hipocampo. Os axônios das fibras musgosas do hipocampo são um exemplo de via cerebrocortical cujos neurônios armazenam e liberam zinco e glutamato. Entretanto, vale destacar que nem todos os neurônios glutamatérgicos liberam zinco (FREDERICKSON *et al.*, 2000a; FREDERICKSON, KOH e BUSH, 2005).

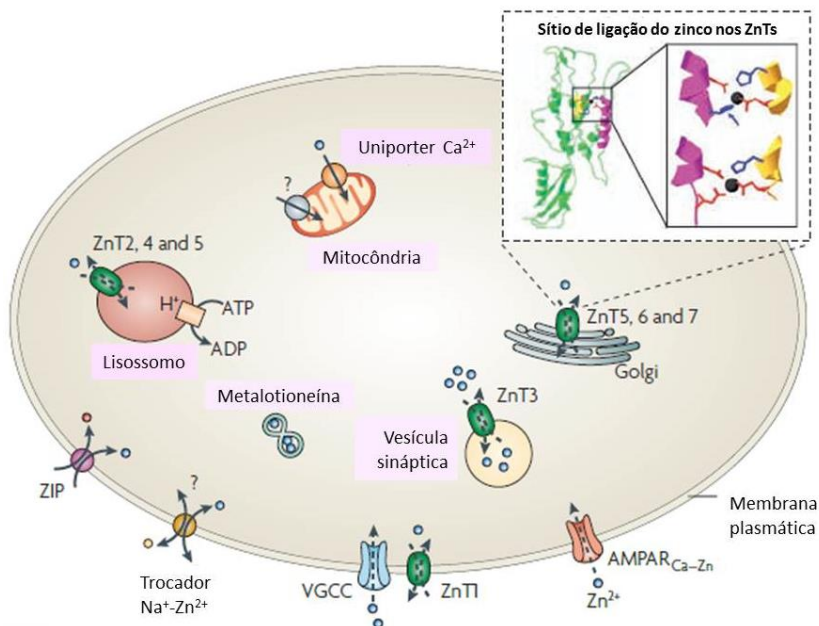
O zinco também possui um papel dinâmico no encéfalo, podendo influenciar tanto na fisiologia quanto na fisiopatologia (SENSI *et al.*, 2009). Como revisado por Takeda (2014), a concentração extracelular de zinco no encéfalo é menor que 1 μM . Já em relação ao zinco sináptico, a concentração exata do zinco ainda é controversa, mas sugere-se que varie normalmente de 10 nM - 100 μM , podendo chegar até 300 μM (VOGT *et al.*, 2000; QIAN e NOEBELS, 2005; FREDERICKSON *et al.*, 2006; PAOLETTI *et al.*, 2009; KAMBE *et al.*, 2015). Após avaliar as regiões do hipocampo, Komatsu e colaboradores (2005) estimaram que a concentração de zinco liberado após despolarização induzida por potássio é em torno de 1 μM no giro denteado, mas não chega a mais de 100 nM nas regiões CA1 e CA3. Takeda *et al.* (2001) também demonstraram que, de acordo com a região encefálica, a concentração de zinco varia de 0,1 até 18 $\mu\text{g/g}$ por peso úmido, sendo que as maiores concentrações foram observada no hipocampo e na amígdala. Já no fluido cerebrospinal, a concentração do zinco é de aproximadamente 0,15 μM (HERSHEY *et al.*, 1983).

Como revisado por Sensi e colaboradores (2009) e esquematizado na **Figura 11**, a homeostase do zinco nos neurônios envolve a ação de várias proteínas e transportadores. O zinco entra nos neurônios

principalmente pela ativação dos canais de cálcio dependentes de voltagem e dos receptores AMPA permeáveis ao cálcio e ao zinco. Na membrana plasmática, ZnT1 controla o efluxo de zinco e pode interagir com os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e regular o influxo de cálcio e zinco. O trocador sódio-zinco (membro da superfamília de trocadores sódio-cálcio) pode mover o zinco para dentro ou para fora do neurônio de acordo com o gradiente de sódio. Outro transportador presente na membrana plasmática é o Zip, que age como cotransportador de zinco e íons hidrogênio ou bicarbonato, facilitando o influxo de zinco para dentro do neurônio. Dentro do neurônio, ZnTs agem como trocador de zinco e íons hidrogênio e podem ser encontrados no aparelho de Golgi (ZnT5, 6 e 7), lisossomos (ZnT2, 4 e 5) e vesícula sináptica (ZnT3). A mitocôndria também sequestra zinco através da ativação de um sistema uniporte de cálcio e através de um mecanismo independente do uniporte de cálcio, mas que ainda não é bem identificado. Por fim, as metalotioneínas também são muito importantes para a manutenção da homeostase do zinco, sendo consideradas as principais proteínas de tamponamento do zinco no neurônio (SENSI *et al.*, 2009).

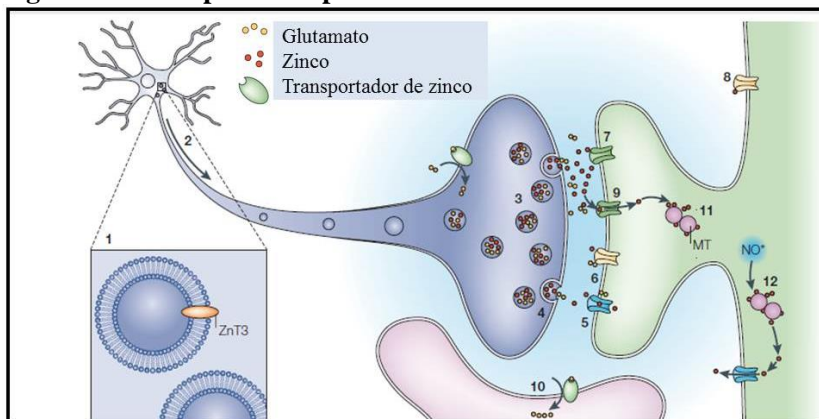
Embora o papel das células gliais na homeostase do zinco não seja totalmente elucidado, sabe-se que principalmente os astrócitos e a microglia também participam da regulação da quantidade de zinco na sinapse (HANCOCK, FINKELSTEIN e ADLARD, 2014). Os astrócitos captam o zinco intracelular principalmente através dos transportadores ZnT1 (NOLTE *et al.*, 2004). Estudo com cultura de astrócitos também evidenciou a presença de Zip14 nesse tipo celular (BISHOP *et al.*, 2010). Além disso, a presença de metalotioneínas nos astrócitos também auxilia na homeostase do zinco (MALAIYANDI, DINELEY e REYNOLDS, 2004). Na microglia, também já foi demonstrado que a captação do zinco pode ser realizada, pelo menos em parte, pela presença de Zip1 (HIGASHI *et al.*, 2011). Em células gliais do cerebelo também foi demonstrada a presença de ZnT1, ZnT3 e ZnT4 (WANG *et al.*, 2005).

Figura 11. Homeostase do zinco nos neurônios



Legenda: O zinco entra nos neurônios principalmente pela ativação dos VGCC e $\text{AMPA}_{\text{Ca-Zn}}$. Na membrana plasmática, ZnT1 controla o efluxo de zinco e pode interagir com os VGCC do tipo L e regular o influxo de cálcio e zinco. O trocador $\text{Na}^+ - \text{Zn}^{2+}$ pode mover zinco para dentro ou para fora do neurônio de acordo com o gradiente de sódio. O Zip age como cotransportador de zinco e íons hidrogênio ou bicarbonato, facilitando o influxo de zinco. Dentro do neurônio, ZnTs agem como trocador de zinco e íons hidrogênio e podem ser encontrados no aparelho de Golgi, lisossomos e vesícula sináptica. A mitocôndria também sequestra zinco através da ativação de um transporte uniporte de cálcio, bem como por um mecanismo independente do uniporte de cálcio ainda não bem identificado. Por fim, as metalotioneínas são muito importantes para a manutenção da homeostase do zinco. A figura também mostra um modelo esquemático do sítio de ligação do zinco na proteína ZnT. Abreviaturas: $\text{AMPA}_{\text{Ca-Zn}}$, receptores AMPA permeáveis ao cálcio e ao zinco; VGCC, canais de cálcio dependentes de voltagem; Zip, proteínas de importação do zinco; ZnT, transportador de zinco. Fonte: adaptado de Sensi *et al.* (2009).

As vesículas contendo zinco e glutamato são sintetizadas no aparelho de Golgi, e possuem ZnT3 (que transporta o zinco para dentro da vesícula) e transportador de glutamato vesicular (que transporta o glutamato para dentro da vesícula) (SALAZAR *et al.*, 2005; PAOLETTI *et al.*, 2009). Vale destacar que animais *knockout* para ZnT3 são deficientes em zinco sináptico, ressaltando a importância desse transportador para as concentrações de zinco nas vesículas sinápticas (LOPANTSEV *et al.*, 2003). O esquema do transporte sináptico do zinco é mostrado na **Figura 12**. As vesículas são armazenadas no terminal axonal e, quando ocorre o estímulo apropriado (despolarização e entrada de cálcio), o glutamato e o zinco são liberados na fenda sináptica. O zinco pode se ligar em receptores de glutamato (explanado mais a frente) ou pode se ligar em outros receptores que não são glutamatérgicos. O zinco também tem a capacidade de entrar nos neurônios pós-sinápticos através de canais permeáveis ao zinco (todos os canais de cálcio também são permeáveis ao zinco). Dentro dos neurônios pós-sinápticos, o zinco é armazenado nas metalotioneínas. Quando ocorre oxidação e nitrosilação dos tióis da metalotioneína, a mesma libera o zinco do neurônio pós-sináptico (FREDERICKSON, KOH e BUSH, 2005). Recentemente foi evidenciado que a região CA1 hipocampal tem altas concentração de ZnT1 nas espinhas dendríticas pós-sinápticas e que, esse transportador, poderia auxiliar na homeostase do zinco encefálico (SINDREU *et al.*, 2014).

Figura 12. Transporte sináptico do zinco

Legenda: O zinco é transportado para vesículas que contém glutamato através de transportadores de zinco (ZnT-3) (1). Essas vesículas são transportadas pelo axônio (2) e armazenadas no terminal axonal (3). Quando ocorre um estímulo adequado, o glutamato e o zinco são liberados para a fenda sináptica (4). O zinco pode se ligar em receptores no neurônio pós-sináptico (6, 7 e 8) ou entrar no neurônio pós-sináptico através de canais permeáveis ao zinco (5 e 9). Glutamato também pode se ligar em receptores pós-sinápticos (6) ou ser captado para as células gliais (10). Dentro do neurônio pós-sináptico, o zinco é armazenado nas metalotioneínas (MT) (11). A oxidação e nitrosilação dos tioss da metalotioneína liberam o zinco do neurônio pós-sináptico (12). Fonte: adaptado de Frederickson, Koh e Bush (2005).

O zinco tem a capacidade de inibir receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA, sendo considerado um antagonista parcial desse receptor. Isso ocorre por dois mecanismos: a) em concentrações baixas (10-20 nM), o zinco pode inibir o receptor NMDA por um mecanismo independente de voltagem na subunidade GluN2A (inibição não competitiva); b) em concentrações maiores que 20 μ M, o zinco inibe os receptores NMDA por um mecanismo dependente de voltagem na subunidade GluN2B do receptor NMDA (FREDERICKSON, KOH e BUSH, 2005; GIELEN *et al.*, 2008; PAOLETTI *et al.*, 2009; SENSI *et al.*, 2009; SENSI *et al.*, 2011). Corroborando esses achados, ratos alimentados com dieta deficiente em zinco por 4 ou 6 semanas tiveram um aumento no imunoconteúdo das subunidades GluN2A e GluN2B no hipocampo, acompanhado de uma diminuição dos níveis de BDNF e do

CREB fosforilado. Além disso, a subunidade GluN2A também aumentou no córtex pré-frontal após 6 semanas de dieta deficiente em zinco (DOBOSZEWSKA *et al.*, 2014). O zinco também parece modular os receptores AMPA que estão colocalizados com os receptores NMDA em neurônios pós-sinápticos. Embora os efeitos do zinco nos receptores AMPA não estejam totalmente elucidados, acredita-se que o zinco aumente a ativação desses receptores (em concentrações livres extracelulares menores de 300 μM), os quais são menos sensíveis ao zinco comparado com os receptores NMDA. Além disso, sugere-se que a subunidade GluA3 do receptor AMPA é necessária para a modulação do zinco. Entretanto, em concentrações livres extracelulares maiores de 500 μM , o zinco pode inibir os receptores AMPA (RASSENDREN *et al.*, 1990; LIN, COHEN e COULTER, 2001; PAOLETTI *et al.*, 2009; MLYNIEC *et al.*, 2015b). O zinco também pode modular a neurotransmissão glutamatérgica por inibir, de forma parcial e não competitiva, o EAAT1 presente nas células da retina, interagindo com os resíduos de histidina (nas posições 146 e 156) desse transportador (VANDENBERG, MITROVIC e JOHNSTON, 1998). Já no cerebelo, o zinco inibiu a condutância do ânion cloreto pelo EAAT4 por interagir com os resíduos de histidina (nas posições 146 e 156) (MITROVIC, PLESKO e VANDENBERG, 2001).

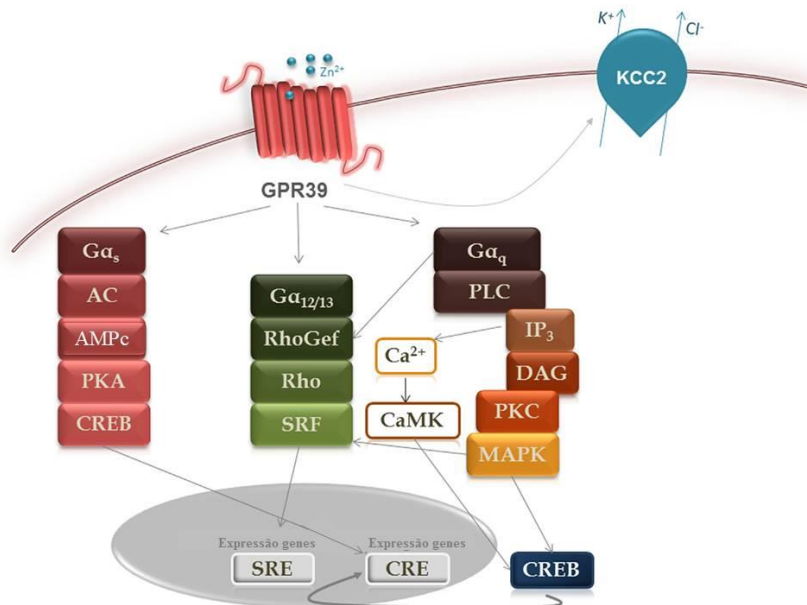
O zinco também tem a capacidade de modular outros receptores, canais ou transportadores no SNC, muitas vezes exercendo efeitos duais de acordo com sua concentração. Entre os receptores, destacam-se receptores para o GABA, serotonina, dopamina, acetilcolina, adenosina, glicina, opioide, entre outros. O zinco também tem a capacidade de interagir com os transportadores de glutamato e glutamina, diminuindo a captação dos mesmos. Já os canais que podem ser modulados, destacam-se canais de sódio, potássio, cálcio e cloreto (FREDERICKSON, KOH e BUSH, 2005; MARGER, SCHUBERT e BERTRAND, 2014). O zinco também pode modular canais no neurônio pré-sináptico, principalmente canais de cálcio ativados por alta-voltagem que estão correlacionados com a liberação de neurotransmissores dependentes de cálcio, como o glutamato (MAGISTRETTI *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2007). Entretanto, vale destacar que esses efeitos não são totalmente elucidados e que existe a necessidade de estudos adicionais para o melhor entendimento do efeito do zinco nesses receptores, canais e transportadores.

O zinco também pode ligar em receptores próprios chamados GPR39 (YASUDA *et al.*, 2007; BESSER *et al.*, 2009), que são receptores acoplados a proteína G, e que são amplamente expressos no

SNC (HOWARD *et al.*, 2001). No encéfalo de ratos, elevadas concentrações do RNAm desse receptor foram observadas no hipocampo, amígdala e córtex auditivo (JACKSON, NOTHACKER e CIVELLI, 2006). Em humanos, como revisado por Popovics e Stewart (POPOVICS e STEWART, 2011), inúmeras regiões encefálicas expressam o GPR39, incluindo a amígdala, hipocampo, hipotálamo, córtex, tálamo, substância negra, cerebelo, entre outras. Como demonstrado na **Figura 13**, o GPR39 pode se acoplar a três proteínas G diferentes ($G\alpha_s$, $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_q$), que poderão ativar diferentes vias de sinalização intracelular: a) a proteína $G\alpha_s$ irá ativar a via da PKA; b) a proteína $G\alpha_{12/13}$ irá ativar o fator de resposta sérica; c) a proteína $G\alpha_q$ irá ativar a via da PKC, CAMK e MAPK. As vias da PKA, PKC, CAMK e MAPK podem culminar com a ativação de CREB, com posterior aumento de diversos genes, incluindo o do BDNF. Já a via do fator de resposta sérica, se ligará ao elemento de resposta sérica, aumentando a transcrição de genes envolvidos com organização do citoesqueleto, crescimento e sinalização celular e circuitaria neuronal (POPOVICS e STEWART, 2011; MLYNIEC *et al.*, 2015b). Além disso, a ativação do receptor GPR39, e posterior ativação da ERK1/2, pode ativar o cotransportador de potássio e cloreto (KCC2), pelo menos em neurônios da região CA3 do hipocampo. A saída de potássio e cloreto a partir do cotransportador KCC2 ativa receptores GABA_A, permitindo a entrada de ânions cloreto, aumentando o tônus inibitório no neurônio pós-sináptico (CHORIN *et al.*, 2011; MLYNIEC *et al.*, 2015b).

É interessante salientar que camundongos que receberam uma dieta deficiente em zinco por 6 semanas, apresentaram uma diminuição na expressão do GPR39 (em 53%) e do BDNF (em 49%) no córtex frontal (MLYNIEC *et al.*, 2013b). A diminuição na expressão do GPR39 também foi observada no hipocampo e no córtex frontal de camundongos e ratos alimentados com dieta deficiente em zinco, bem como no hipocampo e córtex cerebral de seres humanos vítimas de suicídio (MLYNIEC *et al.*, 2014). Um estudo pré-clínico também demonstrou que o tratamento por 14 dias com os antidepressivos escitalopram, reboxetina e bupropiona aumentaram o imunocontéudo do GPR39 no córtex frontal de camundongos, embora o antidepressivo imipramina não tenha causado o mesmo resultado (MLYNIEC e NOWAK, 2013).

Figura 13. Vias de sinalização envolvidas da ativação do receptor do zinco GPR39



Legenda: O zinco pode se ligar em seus receptores GPR39. Quando ativado, esse receptor pode ativar 3 tipos de proteína G: a proteína $G\alpha_s$ irá ativar a via da PKA, a proteína $G\alpha_{12/13}$ irá ativar a via do SRF e a proteína $G\alpha_q$ irá ativar as vias da PKC, CAMK, MAPK. PKA, PKC, CAMK, MAPK podem ativar o CREB, que se liga ao CRE no núcleo, enquanto que o SRF se ligará ao SRE. CRE e SRE levarão ao aumento de expressão de diversos genes. GPR39 também pode ativar KCC2, que aumentará o tônus inibitório no neurônio pós-sináptico. Abreviaturas: AC, adenilato ciclase; AMPc, 3,5'-monofosfato de adenosina cíclico; CAMK, proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; DAG, diacilglicerol; IP₃, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; KCC2, cotransportador de potássio e cloreto; MAPK, proteína cinase ativada por mitógeno; PKA, proteína cinase A; PKC, proteína cinase C; PLC, fosfolipase C; Rho, proteína de ligação ao GTP; RhoGef, fator de troca da guanosina Rho; SRE, elemento de resposta sérica; SRF, fator de resposta sérica. Fonte: adaptado de Mlyniec *et al.* (2015b).

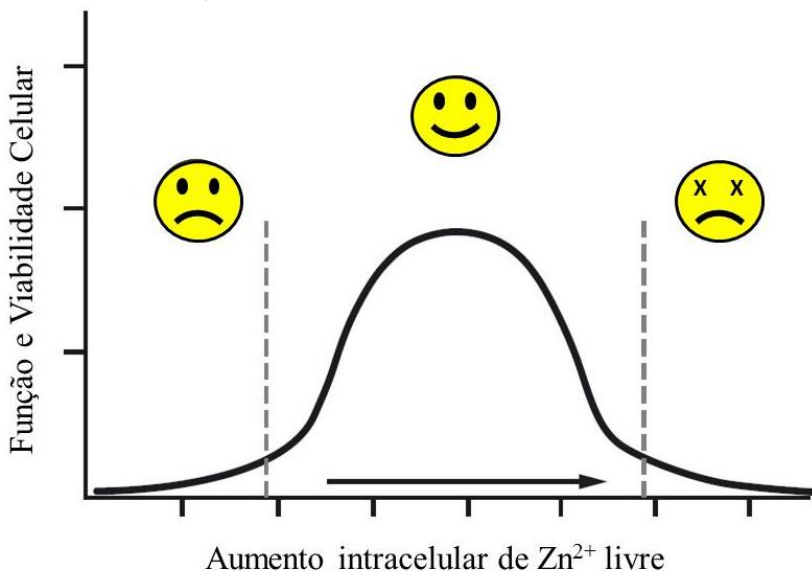
Dessa forma, o zinco é considerado um mineral muito importante para o SNC, participando de várias funções. Dentre suas funções, destaca-se o seu papel no desenvolvimento do SNC, principalmente para a proliferação dos neurônios e neurogênese (GOWER-WINTER e LEVENSON, 2012). Sugere-se que o zinco também seja importante para a neurogênese nos adultos. Ratos alimentados com dieta deficiente em zinco apresentaram uma redução em torno de 50% na proliferação de precursores neuronais na zona subgranular e na camada de células granulares do giro dentado, bem como um aumento na morte celular por apoptose na zona subgranular no hipocampo (CORNIOLA *et al.*, 2008). Além disso, ratos adultos alimentados com dieta deficiente em zinco tiveram um prejuízo no aprendizado, além de diminuição dos níveis de zinco no hipocampo e córtex cerebral (TAKEDA *et al.*, 2000).

Ressalta-se que, embora o zinco apresente essas funções importantes para o SNC, o excesso desse nutriente pode ser tóxico, estando envolvido em situações como traumas, isquemias e acidente vascular encefálico (SUH *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002; GOWER-WINTER e LEVENSON, 2012). Em situações patológicas, níveis neurotóxicos de zinco livre (vindos da liberação das vesículas sinápticas ou de outros *pools* intracelulares que contem zinco) podem se acumular nos neurônios (GOWER-WINTER e LEVENSON, 2012). Além de estar envolvido em algumas patologias, o zinco em excesso também pode ocasionar morte neuronal e glial, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (CHOI, YOKOYAMA e KOH, 1988; CHOI e KOH, 1998; KIM *et al.*, 1999). Doses de zinco acima de 100 μM induzem a disfunção mitocondrial e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, o que podem ser, pelo menos em parte, os responsáveis pela neurotoxicidade induzida pelo zinco. Em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, o zinco tem efeitos duais, sendo que tanto a falta quanto o excesso podem piorar essa doença (CORONA *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2014). Camundongos suplementados com alta dose de zinco (60 ppm) por 3 meses tiveram uma deficiência no zinco hipocampal e prejuízo na memória com inibição da sinalização do BDNF (YANG *et al.*, 2013). Em epilepsia, o zinco também apresenta um papel dual, podendo ser pró ou anticonvulsivante, de acordo com a dose. O zinco pode amenizar a epilepsia em doses baixas ou piorar as crises em doses altas (FORESTI *et al.*, 2008; BARAKA, HASSAB EL NABI e EL GHOTNI, 2012; GOWER-WINTER e LEVENSON, 2012).

Dessa forma, como esquematizado na **Figura 14**, o zinco livre intracelular deve estar em uma concentração ótima para o bom funcionamento e viabilidade celular. Se as concentrações intracelulares

de zinco estão baixas, o zinco não fica disponível para cumprir suas funções celulares, além de prejudicar a sinalização e divisão celular. Por outro lado, pode ocorrer toxicidade quando se tem excesso de zinco intracelular (em concentrações acima de 400-600 nM em neurônios) (COLVIN *et al.*, 2003).

Figura 14. Relação entre as concentrações de zinco livre e a viabilidade e função celular



Legenda: Ilustração demonstrando que as concentrações de zinco intracelular precisam estar em valores ótimos para que o zinco exerça seu papel na função e viabilidade celular e tanto a deficiência quanto o excesso podem ocasionar prejuízo nessas funções. Para a esquerda do gráfico, é demonstrado um estado de deficiência de zinco. Para o lado direito do gráfico, é demonstrado um estado de excesso de zinco, que já começa a ser tóxico para o neurônio acima de 400-600 nM. Fonte: adaptado de Colvin *et al.* (2003).

1.3.3 Zinco e depressão

De todas as doenças envolvendo o SNC, aquela que tem mais estudos com o zinco é a depressão. Na literatura encontramos, inclusive, diversos estudos de revisão que abordam o papel do zinco no tratamento da depressão (NOWAK e SZEWCZYK, 2002; NOWAK, SZEWCZYK

e PILC, 2005; SZEWCZYK *et al.*, 2008; COPE e LEVENSON, 2010; SZEWCZYK, KUBERA e NOWAK, 2010; LAI *et al.*, 2012; SIWEK *et al.*, 2013; SWARDFAGER *et al.*, 2013; MLYNIEC *et al.*, 2015b; NOWAK, 2015).

O primeiro estudo que sugeriu uma correlação entre zinco e depressão foi em 1985, que demonstrou que os pacientes com depressão tinham um aumento da relação cobre:zinco (VAN KEMPEN, GOEKOOP e DE WOLFF, 1985). Em 1989 foi demonstrada uma maior prevalência da deficiência de zinco em pacientes com depressão (LITTLE *et al.*, 1989). Desde então, diversos estudos clínicos também sugeriram essa correlação entre diminuição de zinco sérico/plasmático ou deficiência de zinco dietético e depressão (MCLOUGHLIN e HODGE, 1990; MAES *et al.*, 1994; MAES *et al.*, 1997; MAES *et al.*, 1999; PEPERSACK *et al.*, 2001; STANLEY e WAKWE, 2002; MOUSAVI, HABIBOLLAHI e MAHMOUDIAN, 2006; WOJCIK *et al.*, 2006; SALIMI *et al.*, 2008; AMANI *et al.*, 2010; IRMISCH, SCHLAEFKE e RICHTER, 2010; MASEREJIAN, HALL e MCKINLAY, 2012; HASSAN *et al.*, 2014; VASHUM *et al.*, 2014; ROOMRUANGWONG *et al.*, 2016). Além disso, pacientes que respondem ao tratamento com antidepressivos também possuem níveis séricos de zinco maiores do que pacientes resistentes ao tratamento (SIWEK *et al.*, 2010). Por outro lado, existem três estudos clínicos que não demonstraram essa correlação entre diminuição de zinco e depressão (NARANG *et al.*, 1991; LEHTO *et al.*, 2013; EDALATI-FARD *et al.*, 2016). Entretanto, vale destacar que o estudo de Narang e colaboradores (1991) demonstraram que pacientes que responderam ao tratamento da depressão tinham níveis séricos de zinco maiores do que os pacientes que ainda tinham depressão. Digno de nota, em uma meta-análise avaliando 17 estudos (1643 pacientes depressivos e 804 controles), foi comprovada a associação entre depressão e baixas concentrações de zinco no sangue (sérico/plasmático) (SWARDFAGER *et al.*, 2013). Um recente estudo também demonstrou que pacientes com transtorno bipolar na fase depressiva também possuem níveis menores de zinco quando comparados com pacientes com transtorno bipolar na fase maníaca ou na remissão ou com pacientes saudáveis (SIWEK *et al.*, 2016).

Estudos clínicos também evidenciam que a suplementação com zinco pode diminuir os sintomas depressivos (NOWAK *et al.*, 2003a; SIWEK *et al.*, 2010; RANJBAR *et al.*, 2013; RANJBAR *et al.*, 2014). O primeiro estudo com suplementação de zinco em pacientes com depressão demonstrou que a coadministração de antidepressivo com 25

mg/dia de zinco por 6 ou 12 semanas reduziu mais os sintomas depressivos do que comparado com os indivíduos que receberam somente antidepressivo (NOWAK *et al.*, 2003a). Posteriormente, em outros dois estudos semelhantes, também foi demonstrado que essa mesma dose de zinco (25 mg/dia) por 12 semanas também melhorou mais os sintomas depressivos comparado aos pacientes que só receberam antidepressivo (citalopram ou fluoxetina) (RANJBAR *et al.*, 2013; RANJBAR *et al.*, 2014). Em outro estudo com suplementação de zinco (25 mg/dia, por 12 semanas) foi demonstrado que o zinco melhorou os sintomas depressivos em pacientes que eram resistentes ao tratamento com imipramina, mas não exerceu efeito em pacientes que respondiam ao tratamento com antidepressivo (SIWEK *et al.*, 2009).

Existem também dois estudos que demonstraram o benefício da suplementação de zinco no humor de indivíduos que não tinham depressão diagnosticada (SAWADA e YOKOI, 2010; SOLATI *et al.*, 2015). Em mulheres jovens foi demonstrado que a suplementação com zinco (7 mg/dia por 10 semanas) diminuiu os sintomas de raiva, hostilidade e depressão (SAWADA e YOKOI, 2010). Já em pacientes com sobrepeso ou obesidade, a suplementação com zinco (30 mg/dia por 12 semanas) também diminuiu os sintomas depressivos nos indivíduos (SOLATI *et al.*, 2015).

Em relação aos possíveis mecanismos de ação do zinco em humanos, ainda existem poucos estudos. Em pacientes com sobrepeso ou obesidade (mas sem diagnóstico de depressão) a suplementação de zinco (30 mg/dia de zinco por 12 semanas) aumentou os níveis séricos de zinco e de BDNF. Além disso, foi observada uma correlação inversa entre os níveis de BDNF e a severidade dos sintomas depressivos (SOLATI *et al.*, 2015). Entretanto, em outro estudo, a suplementação com zinco (25 mg/dia por 12 semanas) em pacientes depressivos não influenciou nos níveis de BDNF, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α (RANJBAR *et al.*, 2014).

Digno de nota, no hipocampo de vítimas de suicídio foi demonstrada uma diminuição na potência do zinco e do magnésico em inibir a ligação do MK-801 no receptor NMDA. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que essas alterações foram associadas com aumento dos níveis do GluN2A e diminuição do GluN2B e PSD-95, sugerindo que vítimas de suicídio possuem alterações nos níveis de zinco e nos receptores NMDA (podendo levar a uma hiperatividade desse receptor) (SOWA-KUCMA *et al.*, 2013). A **Tabela 3** é composta pelos principais estudos clínicos relacionando zinco e depressão. Mais detalhes sobre os estudos estão presentes no **Apêndice A**.

Tabela 3. Estudos clínicos relacionando zinco e depressão

Estudos clínicos	
Principais achados	Referências
- Pacientes com depressão tem aumento da relação cobre:zinco.	(VAN KEMPEN, GOEKOOP e DE WOLFF, 1985)
- Pacientes com depressão tem menores níveis de zinco sérico/plasmático.	(LITTLE <i>et al.</i> , 1989; MCLOUGHLIN e HODGE, 1990; MAES <i>et al.</i> , 1994; MAES <i>et al.</i> , 1999; STANLEY e WAKWE, 2002; MOUSAVI, HABIBOLLAHI e MAHMOUDIAN, 2006; SALIMI <i>et al.</i> , 2008; AMANI <i>et al.</i> , 2010; SIWEK <i>et al.</i> , 2010; ROOMRUANGWONG <i>et al.</i> , 2016)
- Quanto mais sintoma de depressão pós-parto, menores os níveis de zinco sérico.	(WOJCIK <i>et al.</i> , 2006; ROOMRUANGWONG <i>et al.</i> , 2016)
- Pacientes com transtorno bipolar na fase depressiva tem menores níveis de zinco sérico quando comparado com pacientes na fase maníaca, na remissão ou com pacientes saudáveis.	(SIWEK <i>et al.</i> , 2016)
- Pacientes deficientes em zinco (zinco plasmático) tem mais sintomas de depressão.	(PEPERSACK <i>et al.</i> , 2001)
- Pacientes tratados da depressão têm níveis séricos de zinco maior que indivíduos com depressão não tratados.	(NARANG <i>et al.</i> , 1991)
- Zinco sérico é menor em indivíduos resistentes ao tratamento.	(MAES <i>et al.</i> , 1997; MAES <i>et al.</i> , 1999)
- Correlação inversa entre zinco sérico e severidade/sintomas da depressão.	(MAES <i>et al.</i> , 1997; PEPERSACK <i>et al.</i> , 2001; AMANI <i>et al.</i> , 2010; IRMISCH, SCHLAEFKE e RICHTER, 2010; HASSAN <i>et al.</i> , 2014)

<p>- Pacientes tratados com antidepressivos têm níveis séricos de zinco maiores do que pacientes resistentes ao tratamento.</p>	<p>(SIWEK <i>et al.</i>, 2010)</p>
<p>- Sem diferença entre os níveis de zinco sérico entre pacientes depressivos e controles.</p>	<p>(NARANG <i>et al.</i>, 1991)</p>
<p>- Sem diferença entre os níveis séricos de zinco e sintomas de depressão pós-parto.</p>	<p>(EDALATI-FARD <i>et al.</i>, 2016)</p>
<p>- Mulheres (mas não homens) que tem ingestão menor de zinco (dietético ou suplementado), possuem maior probabilidade de apresentar sintomas depressivos.</p>	<p>(MASEREJIAN, HALL e MCKINLAY, 2012)</p>
<p>- Ingestão dietética de zinco não influencia na prevenção da depressão.</p>	<p>(LEHTO <i>et al.</i>, 2013)</p>
<p>- Associação inversa entre ingestão de zinco dietético e risco de depressão.</p>	<p>(AMANI <i>et al.</i>, 2010; VASHUM <i>et al.</i>, 2014)</p>
<p>- No hipocampo de vítimas de suicídio há uma diminuição na potência do zinco e magnésico em inibir a ligação do MK-801 no receptor NMDA. Essas alterações são associadas com um aumento dos níveis do GluN2A e diminuição do GluN2B e PSD-95.</p>	<p>(SOWA-KUCMA <i>et al.</i>, 2013)</p>
<p>- Suplementação com zinco reduz sintomas depressivos em pacientes com depressão.</p>	<p>(NOWAK <i>et al.</i>, 2003a; SIWEK <i>et al.</i>, 2009; RANJBAR <i>et al.</i>, 2013; RANJBAR <i>et al.</i>, 2014)</p>
<p>- Suplementação com zinco reduz sintomas depressivos em pacientes sem depressão.</p>	<p>(SAWADA e YOKOI, 2010; SOLATI <i>et al.</i>, 2015)</p>

- Suplementação com zinco em pacientes sem depressão aumenta os níveis séricos de zinco e de BDNF.	(SOLATI <i>et al.</i> , 2015)
- Suplementação com zinco em pacientes depressivos não influencia nos níveis de BDNF, interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α .	(RANJBAR <i>et al.</i> , 2014)

Abreviaturas: BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; NMDA, N-metil-D-aspartato. Fonte: próprio autor.

Estudos pré-clínicos também demonstram que a administração de zinco induz um comportamento tipo-antidepressivo. Esses estudos foram realizados tanto em camundongos quanto em ratos e a administração de zinco foi realizada de forma aguda ou repetida (variando até 7 dias para camundongos e 30 dias para ratos) (KROCZKA *et al.*, 2000; KROCZKA *et al.*, 2001; SZEWCZYK *et al.*, 2002; NOWAK *et al.*, 2003b; ROSA *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2008; LOBATO *et al.*, 2008; POLESZAK *et al.*, 2008; SZEWCZYK *et al.*, 2009; JOSHI *et al.*, 2012; SAMARDZIC *et al.*, 2013; SZEWCZYK *et al.*, 2015). Alguns estudos também demonstraram que o zinco em dose subativa tem efeito sinérgico com doses subativas de antidepressivos clássicos (KROCZKA *et al.*, 2001; SZEWCZYK *et al.*, 2002; CIESLIK *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2008; SZEWCZYK *et al.*, 2009; JOSHI *et al.*, 2012; WROBEL *et al.*, 2015; DING *et al.*, 2016). Além disso, o zinco também impede o comportamento tipo-depressivo induzido por alguns protocolos como o da bulbectomia olfatória, administração de malation ou dexametasona, estresse crônico imprevisível ou estresse de contenção. Nesses estudos, a administração de zinco variou de 1 dia (com 3 doses) até 21 dias para camundongos e de 3 até 35 dias para ratos (NOWAK *et al.*, 2003b; BROCARDI *et al.*, 2007; CIESLIK *et al.*, 2007; SOWA-KUCMA *et al.*, 2008; WROBEL *et al.*, 2015; DING *et al.*, 2016).

Por outro lado, animais alimentados com dieta deficientes em zinco (por um período de 2 a 6 semanas para ratos ou 2 a 10 semanas para camundongos) tem um comportamento tipo-depressivo (TASSABEHI *et al.*, 2008; WHITTLE, LUBEC e SINGEWALD, 2009; WATANABE *et al.*, 2010; MLYNIEC e NOWAK, 2012; MLYNIEC *et al.*, 2013a; MLYNIEC *et al.*, 2013b; DOBOSZEWSKA *et*

al., 2014; DOBOSZEWSKA *et al.*, 2015). Além disso, existem estudos demonstrando que uma dieta deficiente em zinco impede o efeito de antidepressivos em ratos (TASSABEHJI *et al.*, 2008) e camundongos (MLYNIEC e NOWAK, 2012; MLYNIEC *et al.*, 2013a). Já o tratamento com antidepressivo desipramina impediu o comportamento tipo-depressivo induzido por uma dieta deficiente em zinco em camundongos (WHITTLE, LUBEC e SINGEWALD, 2009). Ratos alimentados com uma dieta deficiente em zinco também tem uma diminuição nos níveis de glutamato, GABA e glutamina no hipocampo (TAMANO *et al.*, 2009) e um aumento de glutamato extracelular hipocampal (após estimulação com cloreto de potássio) (WATANABE *et al.*, 2010). Outro achado em roedores alimentados com uma dieta deficiente em zinco é o aumento nos níveis séricos de corticosterona (WATANABE *et al.*, 2010; MLYNIEC *et al.*, 2015a). Uma dieta deficiente em zinco também diminui os níveis de BDNF no hipocampo (DOBOSZEWSKA *et al.*, 2014; MLYNIEC *et al.*, 2014; DOBOSZEWSKA *et al.*, 2015) e no córtex pré-frontal (MLYNIEC *et al.*, 2013b), bem como a fosforilação de CREB no hipocampo (DOBOSZEWSKA *et al.*, 2014; MLYNIEC *et al.*, 2014; DOBOSZEWSKA *et al.*, 2015). Além disso, a expressão do receptor do BDNF TrkB também está diminuída no hipocampo de roedores alimentados com dieta deficiente em zinco (MLYNIEC *et al.*, 2014). Por outro lado, ocorre um aumento em algumas subunidades do receptor NMDA (GluN1, GluN2A e/ou GluN2B) no hipocampo de roedores submetidos a uma dieta deficiente em zinco (DOBOSZEWSKA *et al.*, 2014; DOBOSZEWSKA *et al.*, 2015).

Além desses estudos com dieta deficiente em zinco demonstrando que a quantidade ingerida desse mineral pode alterar a expressão do BDNF, do seu receptor TrkB ou diminuir a fosforilação do fator de transcrição CREB, outros estudos em roedores também demonstram o envolvimento do BDNF no efeito tipo-antidepressivo do zinco (NOWAK *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2008; CIESLIK *et al.*, 2011; SZEWCZYK *et al.*, 2015). A administração de zinco (variando de 14 até 35 dias) demonstrou ser capaz em aumentar o RNAm do BDNF no córtex (NOWAK *et al.*, 2004; SOWA-KUCMA *et al.*, 2008) e/ou no hipocampo de roedores (SOWA-KUCMA *et al.*, 2008; CIESLIK *et al.*, 2011). Além disso, a administração de zinco por 30 dias também aumentou o imunocontéudo do BDNF e a fosforilação da ERK1/2 no córtex cerebral (FRANCO *et al.*, 2008). Ainda, o tratamento com zinco durante 7 ou 14 dias também aumentou os níveis de proteína do BDNF no hipocampo (SOWA-KUCMA *et al.*, 2008). Agudamente, um estudo

recente demonstrou que o zinco aumentou o imunocontéudo do BDNF em fração enriquecida de sinaptossomo no córtex pré-frontal quando administrado 3 ou 24 horas antes da dosagem desta neurotrofina (SZEWCZYK *et al.*, 2015).

Estudos em roedores também sugerem que o efeito tipo-antidepressivo do zinco pode envolver, pelo menos em parte, alguns neurotransmissores. Já foi demonstrado, por exemplo, que o tratamento com zinco por 14 dias aumentou a densidade de receptores de serotonina 5-HT_{1A} no hipocampo e 5-HT_{2A} no córtex pré-frontal (CICHY *et al.*, 2009). Por outro lado, o uso de inibidor da síntese de serotonina, bem como de antagonista do receptor 5-HT_{2A/C} e 5-HT_{1A} impediram o efeito tipo-antidepressivo do zinco (SZEWCZYK *et al.*, 2009). O sistema glutamatérgico também parece estar envolvido nos efeitos comportamentais exercidos pelo zinco, como demonstrado através de estudos pré-clínicos que, após a utilização de antagonistas de receptores NMDA, o efeito tipo-antidepressivo do zinco foi bloqueado (ROSA *et al.*, 2003; POLESZAK *et al.*, 2008). Além disso, zinco administrado por 14 dias também diminuiu a afinidade da glicina nos receptores NMDA no córtex frontal (CICHY *et al.*, 2009). Após a utilização de fármacos que influenciam na neurotransmissão adenosinérgica, Lobato e colaboradores (2008) demonstraram que o efeito tipo-antidepressivo do zinco também é dependente da ativação, direta ou indireta, dos receptores de adenosina do tipo A₁ e A_{2A}. De forma similar, o uso de fármacos que estimulam a via da L-arginina – óxido nítrico também impediram os efeitos comportamentais do zinco (ROSA *et al.*, 2003). O zinco também foi eficaz em impedir as alterações bioquímicas induzidas pelo malation (aumento de peroxidação lipídica no córtex cerebral e diminuição de enzimas antioxidantes como a glutationa peroxidase e glutationa redutase no córtex cerebral e hipocampo, respectivamente) (BROCARDI *et al.*, 2007). O zinco, mesmo administrado agudamente, também parece influenciar na via de sinalização da mTOR. Zinco administrado 30 minutos e 3 horas antes da decapitação aumentou a fosforilação da mTOR no córtex pré-frontal (em fração enriquecida com sinaptossomo). Quando administrado 3 horas antes, o zinco aumentou a expressão da GluA1 e da sinapsina 1. O aumento da GluA1 também foi demonstrado quando o zinco foi administrado 24 horas antes da decapitação. Além disso, inibidores de vias de sinalização envolvidas na ativação da mTOR impediram o efeito tipo-antidepressivo do zinco (SZEWCZYK *et al.*, 2015).

Digno de nota, a administração por duas semanas com escitalopram, reboxetina e bupropiona, mas não imipramina, aumentou a

expressão do receptor de zinco GPR39 no córtex pré-frontal de camundongos (MLYNIEC *et al.*, 2013b). Por outro lado, em animais *knockout* para GPR39, o efeito antidepressivo exercido pela imipramina, reboxetina e escitalopram foi impedido, sugerindo que o receptor do zinco é importante para a ação de antidepressivos monoaminérgicos. Entretanto, os efeitos comportamentais do MK-801 (antagonista de receptores NMDA) e da cetamina no TNF continuaram idênticos, independente se o animal tinha ou não GPR39 (MLYNIEC, GAWEL e NOWAK, 2015). Além disso, animais *knockout* para GPR39 também tinham um comportamento tipo-depressivo (MLYNIEC *et al.*, 2015a; MLYNIEC *et al.*, 2016), e níveis menores do imunoconteúdo de CREB e BDNF no hipocampo, mas sem alteração no córtex frontal (MLYNIEC *et al.*, 2015a). Corroborando esses achados, outro estudo reforçou a ideia de que o receptor de zinco GPR39 é importante para a resposta de antidepressivos monoaminérgicos, já que a administração aguda de antidepressivos em animais deficientes em zinco diminuiu a expressão do GPR39, CREB, BDNF e TrkB no córtex pré-frontal. Por outro lado, a administração crônica com os antidepressivos aumentou a expressão dessas proteínas e receptores (MLYNIEC e NOWAK, 2015). Vale destacar que uma dieta deficiente em zinco foi capaz de diminuir a expressão do GPR39 no córtex pré-frontal (MLYNIEC *et al.*, 2013b; MLYNIEC *et al.*, 2014) e no hipocampo de camundongos (MLYNIEC *et al.*, 2014).

É interessante ressaltar que, de acordo com os dados de um recente estudo, os camundongos submetidos a protocolo de estresse de contenção crônico (por 3 semanas), apresentaram uma menor expressão hipocampal do RNAm do GPR39, BDNF e CREB e uma maior expressão hipocampal de receptor NMDA. Essas alterações não ocorreram quando os camundongos foram tratados com zinco ou imipramina (nas doses que diminuem o tempo de imobilidade no TSC) por 3 semanas (após o término do protocolo de estresse). Resultado similar foi encontrado quando os animais receberam a associação de zinco e imipramina (em doses subativas no TSC) (DING *et al.*, 2016).

Desta forma podemos concluir que o zinco parece atuar através de diversas maneiras no encéfalo e não apenas através de um mecanismo único. A **Tabela 4** relaciona os principais estudos pré-clínicos relacionando zinco e depressão. Mais detalhes sobre os estudos estão presentes no **Apêndice B**.

Tabela 4. Estudos pré-clínicos relacionando zinco e depressão

Estudos clínicos	
Principais efeitos	Referências
- Zinco induz um comportamento tipo-antidepressivo em roedores.	(KROCZKA <i>et al.</i> , 2000; KROCZKA <i>et al.</i> , 2001; SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2002; NOWAK <i>et al.</i> , 2003b; ROSA <i>et al.</i> , 2003; CUNHA <i>et al.</i> , 2008; FRANCO <i>et al.</i> , 2008; LOBATO <i>et al.</i> , 2008; POLESZAK <i>et al.</i> , 2008; SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2009; JOSHI <i>et al.</i> , 2012; SAMARDZIC <i>et al.</i> , 2013; SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2015).
- Zinco impede o comportamento tipo-depressivo induzido por alguns protocolos (bulbectomia olfatória, administração de malation ou dexametasona, estresse crônico imprevisível ou estresse de contenção).	(NOWAK <i>et al.</i> , 2003b; BROCARDI <i>et al.</i> , 2007; CIESLIK <i>et al.</i> , 2007; SOWA-KUCMA <i>et al.</i> , 2008; WROBEL <i>et al.</i> , 2015; DING <i>et al.</i> , 2016).
- Roedores alimentados com dieta deficiente em zinco tem um comportamento tipo-depressivo.	(TASSABEHJI <i>et al.</i> , 2008; WHITTLE, LUBEC e SINGEWALD, 2009; WATANABE <i>et al.</i> , 2010; MLYNIEC e NOWAK, 2012; MLYNIEC <i>et al.</i> , 2013a; MLYNIEC <i>et al.</i> , 2013b; DOBOSZEWSKA <i>et al.</i> , 2014; DOBOSZEWSKA <i>et al.</i> , 2015)
- Zinco em dose subativa tem efeito sinérgico quando administrado com doses subativas de antidepressivos.	(KROCZKA <i>et al.</i> , 2001; SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2002; CIESLIK <i>et al.</i> , 2007; CUNHA <i>et al.</i> , 2008; SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2009; JOSHI <i>et al.</i> , 2012; WROBEL <i>et al.</i> , 2015; DING <i>et al.</i> , 2016).

- O sistema serotoninérgico está envolvido no efeito tipo-antidepressivo do zinco.	(CICHY <i>et al.</i> , 2009; SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2009)
- O sistema glutamatérgico, receptores NMDA e/ou a via L-arginina óxido nítrico estão envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do zinco.	(ROSA <i>et al.</i> , 2003; POLESZAK <i>et al.</i> , 2008; CICHY <i>et al.</i> , 2009; TAMANO <i>et al.</i> , 2009; WATANABE <i>et al.</i> , 2010; DOBOSZEWSKA <i>et al.</i> , 2014)
- Os receptores de adenosina A1 e A2A estão envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do zinco.	(LOBATO <i>et al.</i> , 2008)
- O aumento do BDNF está envolvido no efeito tipo-antidepressivo do zinco.	(NOWAK <i>et al.</i> , 2004; FRANCO <i>et al.</i> , 2008; SOWAKUCMA <i>et al.</i> , 2008; CIESLIK <i>et al.</i> , 2011; MLYNIEC <i>et al.</i> , 2013b; DOBOSZEWSKA <i>et al.</i> , 2014; MLYNIEC <i>et al.</i> , 2014; SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2015).
- A modulação de enzimas antioxidantes está envolvida no efeito tipo-antidepressivo do zinco.	(BROCARDI <i>et al.</i> , 2007; FRANCO <i>et al.</i> , 2008)
- A via da mTOR está envolvida no efeito tipo-antidepressivo do zinco.	(SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2015)
- Antidepressivos aumentam a expressão do receptor de zinco GPR39 no córtex pré-frontal.	(MLYNIEC <i>et al.</i> , 2013b)
- Dieta deficiente em zinco diminui os níveis de BDNF e a fosforilação de CREB no hipocampo.	(DOBOSZEWSKA <i>et al.</i> , 2015)
- Dieta deficiente em zinco aumenta as subunidades do receptor NMDA GluN1, GluN2A, GluN2B no hipocampo.	(DOBOSZEWSKA <i>et al.</i> , 2015)
- Dieta deficiente em zinco aumenta os níveis séricos de corticosterona e diminui os níveis do receptor de glicocorticoide no hipocampo e córtex pré-frontal.	(MLYNIEC <i>et al.</i> , 2015a)

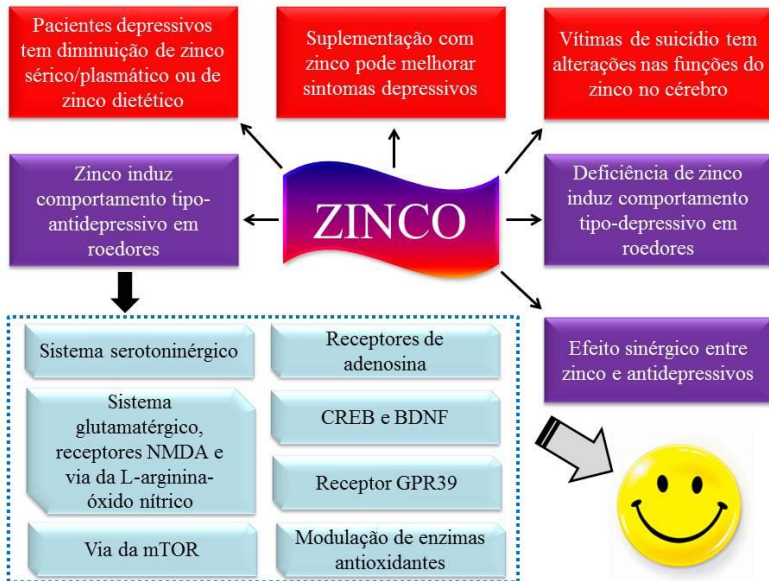
- Dieta deficiente em zinco diminui o imunoconteúdo do receptor do zinco GPR39 no córtex frontal.	(MLYNIEC e NOWAK, 2015)
- Animais sem o receptor de zinco GPR39 tem comportamento tipo-depressivo.	(MLYNIEC <i>et al.</i> , 2015a; MLYNIEC <i>et al.</i> , 2016)
- Animais sem o receptor de zinco GPR39 tem níveis diminuídos de CREB e BDNF no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal.	(MLYNIEC <i>et al.</i> , 2015a)
- Animais sem o receptor de zinco GPR39 não respondem aos antidepressivos monoaminérgicos.	(MLYNIEC, GAWEL e NOWAK, 2015)
- Administração aguda de antidepressivos em animais alimentados com dieta deficiente em zinco diminui o imunoconteúdo do GPR39, CREB, BDNF e TrkB, enquanto que a administração crônica com antidepressivos aumenta a expressão dessas proteínas no córtex frontal.	(MLYNIEC e NOWAK, 2015)
- Zinco em dose ativa ou em dose subativa associada com dose subativa de antidepressivo impedem as alterações na expressão de GPR39, CREB ou BDNF induzidas pelo estresse de contenção	(DING <i>et al.</i> , 2016)

Abreviaturas: BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; NMDA, N-metil-D-aspartato; TrkB, receptor tropomiosina cinase B. Fonte: próprio autor.

Vale ressaltar que em uma revisão sistemática sobre os efeitos do zinco foi proposto que este metal possa ser uma estratégia interessante para tratar a depressão (tanto como coadjuvante quanto administrado isoladamente) (LAI *et al.*, 2012). Entretanto, ainda é necessário mais estudos para esclarecer melhor o papel e a eficácia do zinco.

A **Figura 15** apresenta um esquema dos principais efeitos do zinco na depressão, com um resumo do exposto até o momento.

Figura 15. Principais efeitos do zinco na depressão



Legenda: A associação do zinco com a depressão é suportada através de estudos clínicos (em vermelho) e estudos pré-clínicos (em roxo). Além disso, também existem estudos investigando os possíveis mecanismos pelos quais o zinco atua para melhorar os sintomas depressivos (em azul claro). Abreviaturas: BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; NMDA, N-metil-D-aspartato. Fonte: próprio autor.

2 JUSTIFICATIVA

A depressão é um problema de saúde pública grave, prevalente e que leva a uma diminuição da qualidade de vida, aumento de comorbidades e risco de suicídio, além de altos custos para a sociedade (NEMEROFF, 2007; LEPINE e BRILEY, 2011; THAIPISUTTIKUL *et al.*, 2014). Apesar de os fármacos utilizados para tratar a depressão serem seguros, o tratamento ainda não é o ideal, possuindo limitações, tais como os efeitos colaterais decorrentes do uso dos antidepressivos (SERRETTI e MANDELLI, 2010; BET *et al.*, 2013), um grande número de respostas parciais ou ausência de respostas (RUHE *et al.*, 2011), além de um atraso na remissão dos sintomas, o que dificulta a adesão do paciente ao tratamento (NEMEROFF e OWENS, 2002; UHER *et al.*, 2011).

Levando em consideração todo o impacto (social e pessoal) desse transtorno de humor, esforços têm sido feitos na investigação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da depressão, bem como de compostos que possam melhorar o tratamento da depressão. Embora esse transtorno seja multifatorial, hoje já é claro o papel de eventos estressantes no desenvolvimento da depressão, contribuindo para a hiperativação do eixo HPA e consequente liberação exacerbada de glicocorticoides, ocasionando vários danos no encéfalo, especialmente no hipocampo (NESTLER *et al.*, 2002; DURIC e DUMAN, 2013; FRODL e O'KEANE, 2013). Além disso, outros fatores como alteração das neurotrofinas (GROVES, 2007), excesso de glutamato (SANACORA *et al.*, 2008; ZARATE *et al.*, 2010; HILLHOUSE e PORTER, 2015) e alterações em vias de sinalização intracelular (POPOLI *et al.*, 2000; DUMAN e VOLETI, 2012) também estão envolvidos na fisiopatologia da depressão. Entretanto, muitos mecanismos ainda precisam ser mais esclarecidos e detalhados.

No âmbito do tratamento, vários estudos já investigam práticas terapêuticas alternativas ou estratégias farmacológicas que poderiam melhorar os resultados clínicos da depressão (MANOSSO, MORETTI e RODRIGUES, 2013; CUNHA *et al.*, 2015; LANG *et al.*, 2015; MORETTI *et al.*, 2015). Uma terapêutica de associação com os antidepressivos convencionais envolve a utilização de nutracêuticos, dentre eles, o zinco. Levando em consideração que estudos pré-clínicos (KROCZKA *et al.*, 2001; CUNHA *et al.*, 2008; JOSHI *et al.*, 2012) e clínicos (MAES *et al.*, 1994; SIWEK *et al.*, 2010; RANJBAR *et al.*, 2014) sugerem o envolvimento do zinco na depressão, torna-se relevante a investigação dos possíveis mecanismos intracelulares envolvidos na

ação terapêutica do zinco. Dessa forma, o estudo visa contribuir na investigação do zinco como um possível agente para o tratamento da depressão, além de elucidar melhor os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse transtorno de humor e na ação do zinco.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do zinco em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a participação de vias de sinalização intracelular envolvidas na sinalização do BDNF (PKA, PKC, CAMKII, ERK, PI3K e GSK-3 β) no efeito tipo-antidepressivo do zinco em camundongos submetidos ao TSC.

Verificar se a administração aguda de zinco é capaz de alterar o imunoconteúdo de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos.

Investigar o envolvimento dos receptores TrkB no efeito tipo-antidepressivo do zinco em camundongos submetidos ao TSC.

Analisar a participação da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do zinco em camundongos submetidos ao TSC.

Verificar se a administração aguda de zinco é capaz de alterar o imunoconteúdo da HO-1 no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos.

Investigar os efeitos comportamentais do zinco no modelo de depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível no TSC e TCA.

Determinar a ação do estresse crônico imprevisível e do tratamento com zinco no imunoconteúdo de proteínas envolvidas na neurotransmissão glutamatérgica (GLT-1, EAAC1, GFAP e indiretamente a Akt) no hipocampo de camundongos.

Analisar a ação do estresse crônico imprevisível e do tratamento com zinco na viabilidade celular de fatiais hipocampais expostas ao glutamato.

4 RESULTADOS

Os resultados dessa tese estão apresentados em três capítulos. Cada capítulo é composto de uma rápida introdução sobre o tema abordado no capítulo, seguido das metodologias utilizadas, os resultados e as discussões pertinentes a cada capítulo. Além disso, cada capítulo possui conclusões parciais dos resultados obtidos. As referências de todos os capítulos encontram-se no final da tese. Os capítulos são as traduções de três artigos publicados ou submetidos em revistas internacionais:

Capítulo I – Avaliação da via de sinalização do BDNF no efeito tipo-antidepressivo do zinco

“Antidepressant-like effect of zinc is dependent on signaling pathways implicated in BDNF modulation”. Luana M. Manosso, Morgana Moretti, Camille M. Ribeiro, Filipe M. Gonçalves, Rodrigo B. Leal, Ana Lúcia S. Rodrigues. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 59, p. 59–67, 2015.

Manuscrito completo referente aos dois primeiros objetivos específicos da tese, publicado no periódico *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*.

Capítulo II – Avaliação do papel da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do zinco

“Evidence for the involvement of heme oxygenase 1 in the antidepressant-like effect of zinc”. Luana M. Manosso, Morgana Moretti, Julia M. Rosa, Mauricio P. Cunha, Ana Lúcia S. Rodrigues.

Manuscrito completo referente ao terceiro, quarto e quinto objetivos específicos da tese, submetido para publicação no periódico *European Journal of Pharmacology*.

Capítulo III – Avaliação da neurotransmissão glutamatérgica no efeito tipo-antidepressivo do zinco no modelo de estresse crônico imprevisível

“Involvement of glutamatergic neurotransmission in the antidepressant-like effect of zinc in the chronic unpredictable stress model of depression”. Luana M. Manosso, Morgana Moretti, André Colla, Camille M. Ribeiro, Tharine Dal-Cim, Carla I. Tasca, Ana Lúcia S. Rodrigues. *Journal of Neural Transmission*, v. 123, n. 3, p.339-352, 2016.

Manuscrito completo referente aos três últimos objetivos específicos da tese, publicado no periódico *Journal of Neural Transmission*.

CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO BDNF NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ZINCO

Estudos sugerem que o zinco ativa o receptor metabotrópico GPR39 (YASUDA *et al.*, 2007; BESSER *et al.*, 2009), que é um receptor acoplado a proteína G e que é amplamente expresso no SNC (HOWARD *et al.*, 2001). É interessante ressaltar que camundongos alimentados com uma dieta deficiente em zinco por 6 semanas tiveram uma redução na expressão das proteínas GPR39 e BDNF no córtex pré-frontal, além de um comportamento tipo-depressivo (MLYNIEC *et al.*, 2013b). Outro estudo demonstrou que uma dieta deficiente de zinco por 6 semanas propiciou uma diminuição na expressão do CREB e BDNF no hipocampo de camundongos (MLYNIEC *et al.*, 2014). Por outro lado, o tratamento crônico com zinco induziu a um aumento nos níveis de RNAm cortical de BDNF (NOWAK *et al.*, 2004).

O BDNF é uma neurotrofina *downstream* a várias vias de sinalização celular que são implicadas na etiologia da depressão e na ação dos antidepressivos (DUMAN e MONTEGGIA, 2006; CASTREN e RANTAMAKI, 2010). De acordo com uma meta-análise, os pacientes depressivos tem uma diminuição nos níveis séricos e plasmáticos de BDNF (BOCCHIO-CHIAVETTO *et al.*, 2010). Por outro lado, a administração periférica de BDNF produziu um comportamento tipo-antidepressivo em animais (SCHMIDT e DUMAN, 2010) e o tratamento crônico com antidepressivos aumentou os níveis séricos e plasmáticos de BDNF em pacientes depressivos (BRUNONI, LOPES e FREGNI, 2008).

Vale destacar que várias vias de sinalização intracelular podem influenciar, direta ou indiretamente, na ativação do fator de transcrição CREB, que por sua vez, aumentará a expressão do BDNF. Dentre as proteínas que participam dessa sinalização, destacam-se a PKA, PKC, CAMKII, ERK, PI3K e GSK-3 (HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004; MALBERG e BLENDY, 2005). Sendo assim, o objetivo desse capítulo foi investigar se inibidores seletivos dessas proteínas de sinalização (*upstream* ao BDNF) podem influenciar no efeito tipo-antidepressivo exercido pelo zinco. Além disso, investigou-se se a administração aguda do zinco é capaz de aumentar os níveis de BDNF.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 ANIMAIS

Camundongos *Swiss* fêmeas (45-55 dias, pesando 30-45 g) foram mantidas em condição padrão de biotério (20-22°C), com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas (luz acesa às 7:00h). Os animais foram alocados em grupos de 15 em uma caixa com 41×34×16 cm. Os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00h e 16:00h. Os animais foram aclimatizados na sala de experimentação pelo menos 12 horas antes dos testes comportamentais. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° PP00795 – **Anexo A**). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e para reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

1.2 COMPOSTOS E TRATAMENTOS

Os seguintes compostos foram utilizados: cloreto de zinco ($ZnCl_2$) (1 ou 10 mg/kg), H-89 (1 μ g/sítio, inibidor da PKA), KN-62 (1 μ g/sítio, inibidor da CAMKII), queleritrina (1 μ g/sítio, inibidor da PKC), PD98059 (5 μ g/sítio, inibidor da MEK 1/2), U0126 (5 μ g/sítio, inibidor da MEK1/2), LY294002 (10 nmol/sítio, inibidor da PI3K), AR-A014418 (0,001 μ g/sítio, inibidor seletivo da GSK-3 β). Todos os agentes farmacológicos foram obtidas da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA. $ZnCl_2$ foi diluído em água e administrado via oral (p.o.). H-89, KN-62, queleritrina, PD98059, U0126, LY294002, AR-A014418 foram dissolvidos em salina (0,9% NaCl) em uma concentração final de 1% de dimetil sulfoxido (DMSO) e administrado por via intracebroventricular (i.c.v.). Os compostos foram preparados logo antes do tratamento e administrado em um volume de 10 ml/kg (via p.o.) ou 5 μ l/sítio (via i.c.v.). Os animais controles receberam veículo apropriado.

A administração i.c.v. foi realizada como previamente descrito (KASTER *et al.*, 2012). Para a injeção uma agulha 26G foi conectada a uma cânula de polipropileno acoplada a uma microseringa Hamilton de 50 μ l. Os camundongos foram levemente anestesiados com isoflurano (2,5%; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A administração, em um volume de 5 μ l/sítio, foi feita através da inserção da agulha de forma perpendicular através do crânio dos animais. A injeção foi administrada durante 30 s, e manteve-se a agulha no local durante mais 30 s, a fim de evitar o refluxo das substâncias injetadas. O local de injeção foi de 1 mm para a direita ou para a esquerda a partir do ponto médio de uma linha que passa para a base

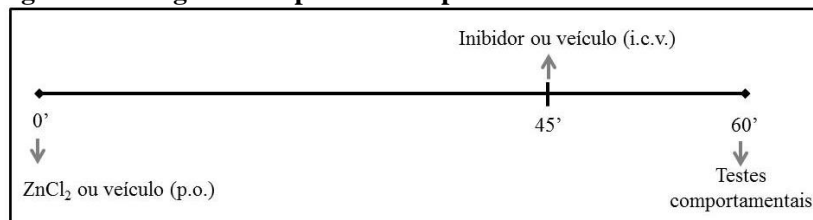
anterior das orelhas. O êxito da injeção foi avaliado, macroscopicamente, descartando os animais cuja injeção foi realizada em local inadequado ou tenha causado hemorragia encefálica (<5%).

Para testar a hipótese de que o efeito tipo-antidepressivo do zinco é dependente da ativação de vias de sinalização intracelular *upstream* ao BDNF, os animais foram tratados com dose ativa de ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) e 45 minutos depois eles receberam H-89, KN-62, PD98059, U0126, queleritrina ou LY294002 (em doses que *per se* não alteram o tempo de imobilidade no TSC). Os animais foram submetidos aos testes comportamentais 15 minutos depois (60 minutos após a administração do ZnCl₂). Além disso, para investigar o possível efeito sinérgico entre o zinco e o inibidor de GSK-3 β , os animais receberam veículo (p.o.) ou dose subefetiva de ZnCl₂ (1 mg/kg). Após 45 minutos, os camundongos receberam uma dose subefetiva de AR-A014418 ou veículo (i.c.v.). Decorridos 15 minutos do último tratamento, os testes comportamentais foram realizados.

A **Figura I.1** mostra o diagrama do protocolo experimental.

As doses de ZnCl₂ foram escolhidas baseadas em experimento prévio do laboratório (CUNHA *et al.*, 2008). As doses de H-89, KN-62, queleritrina, PD98059, U0126, LY294002, e AR-A014418 foram escolhidas com base em experimentos prévios do laboratório e de outros grupos de estudo (ALMEIDA *et al.*, 2006; BUDNI *et al.*, 2011; ZENI *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2014; MORETTI *et al.*, 2014). O número de animais utilizados para os testes comportamentais foram de 7-8 por grupo.

Figura I.1. Diagrama do protocolo experimental



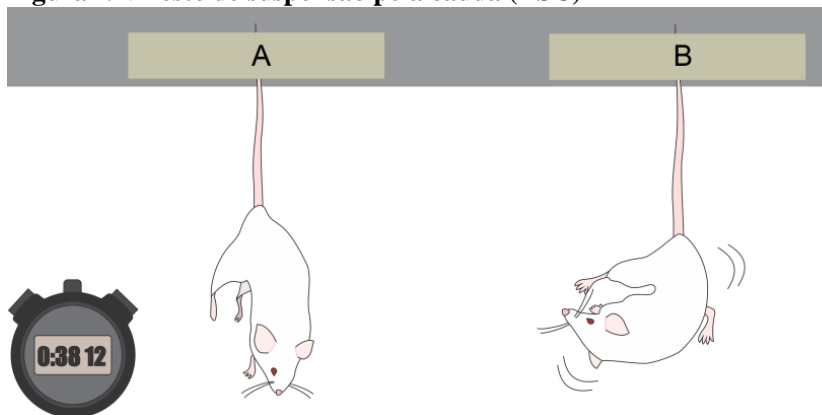
Legenda: Camundongos *Swiss* fêmeas foram tratadas no tempo 0 com ZnCl₂ ou veículo (água) via oral (p.o.). Decorridos 45 minutos, os animais receberam algum dos sete inibidores ou veículo (salina) via i.c.v.. 15 minutos depois, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Abreviaturas: i.c.v., intracerebroventricular;p.o., *per os*; ZnCl₂, cloreto de zinco.

1.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

1.3.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

A duração total de imobilidade induzida pela suspensão da cauda foi mensurada de acordo com a metodologia descrita por Steru *et al.* (1985). Os camundongos foram visualmente isolados e suspensos pela cauda 50 cm acima do chão com auxílio de uma fita adesiva presa cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda. A duração total da imobilidade (ausência de movimento ou movimentação passiva) foi registrada durante um período de 6 minutos por um observador experiente. Uma diminuição do tempo de imobilidade foi considerada um indicativo de efeito tipo-antidepressivo (STERU *et al.*, 1985). A **Figura I.2** mostra um desenho esquemático do TSC.

Figura I.2. Teste de suspensão pela cauda (TSC)



Legenda: Desenho esquemático demonstrando o TSC. a) O camundongo é suspenso acima do chão pela cauda, preso com auxílio de uma fita adesiva. Pelo período de 6 minutos é contabilizado o tempo de imobilidade. b) Quando o camundongo está realizando movimentos voluntários não se registra o tempo. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

1.3.2 Teste do campo aberto (TCA)

A fim de excluir a possibilidade de que uma alteração no tempo de imobilidade seja devido a alguma alteração locomotora, os animais foram submetidos ao TCA durante 6 minutos, como descrito por Rodrigues *et al.* (2002). Esse teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, com a base dividida em 12 quadrados iguais como demonstrado na **Figura I.3**. O número de

quadrados cruzados com as quatro patas é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. A base da caixa foi limpa com álcool 10% entre os testes. O teste foi realizado em uma sala com temperatura e luz controladas.

Figura I.3. Teste do campo aberto (TCA)



Legenda: Desenho esquemático demonstrando o TCA. O camundongo é colocado em uma caixa e durante o período de 6 minutos é contabilizado o número de quadrantes cruzados com as quatro patas como parâmetro de locomoção. A caixa é dividida em 12 quadrantes iguais e possui as seguintes medidas: 40 x 60 x 50 cm. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

1.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Um grupo independente de camundongos (n=4-8 por grupo) foi utilizado para as análises bioquímicas. Os animais receberam (p.o.) veículo ou ZnCl₂ (10 mg/kg). Após 60 minutos, os animais foram decapitados para as análises bioquímicas.

1.4.1 Preparação do tecido

Após a decapitação, o encéfalo de cada animal foi removido e os hipocampo e córtex pré-frontais foram rapidamente dissecados (4°C), colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Resumidamente, os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases Amresco número M222). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de restos celulares. O sobrenadante foi diluído 1/1 (v/v) em solução contendo 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. O restante da amostra foi diluído (glicerol 40%, Tris 25 mM e azul de bromofenol, pH 6,8) em uma proporção de 1:4 (v/v) e β -mercaptoetanol (concentração final de 8%) foi adicionado na amostra. O conteúdo das proteínas foi estimado a partir de uma curva padrão, utilizando albumina de soro bovino (PETERSON, 1977).

1.4.2 Western blotting

A mesma quantidade de proteínas (60 μ g de proteína total/poço) em cada amostra foi separada por eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose usando um aparelho *semi-dry* (1,2 mA/cm²; 1,5 h). Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5%.

Após esse processo, as membranas resultantes foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As formas fosforilada (Ser133) e total de CREB (Cell Signaling, 1:1000) e o imunoconteúdo de BDNF maduro (Santa Cruz, 1:1000) foram detectados com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo albumina de soro bovino (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5). As membranas ficaram 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-coelho conjugado com peroxidase (Millipore 1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante. Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina (Santa Cruz, 1:2000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel e com um anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Millipore 1:4000).

A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando ScionImage software® (Frederick, MD, EUA). O nível de fosforilação do CREB foi determinado pela razão entre a DO da proteína fosforilada / DO da proteína total. O imunoconteúdo do BDNF e do CREB foram determinados pelas relações entre as DO dessas proteínas / DO da β -

actina. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

1.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar o pressuposto de normalidade de dados comportamentais e bioquímicos. Todas as variáveis do presente estudo mostraram uma distribuição normal. Dessa forma, as diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Newman-Keuls quando apropriado (para as análises comportamentais) ou do teste t de Student (para as análises de Western blotting). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados estão expressos em média + erro padrão da média (E.P.M.).

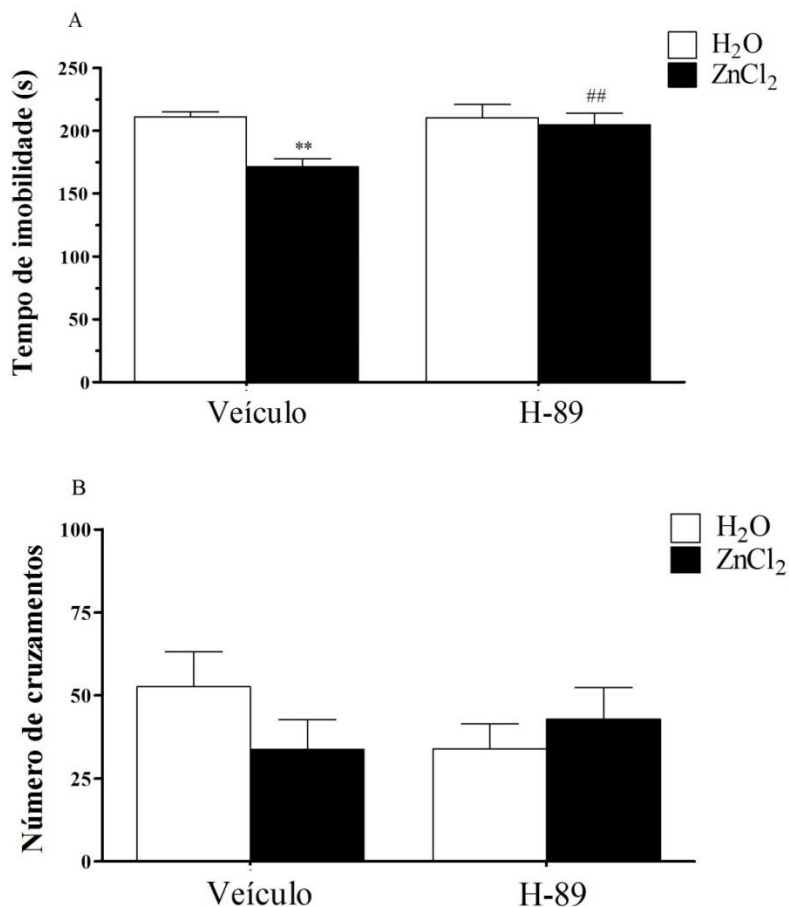
2 RESULTADOS

2.1 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Para avaliar a influencia do tratamento com inibidores de vias de sinalização intracelular no comportamento tipo-antidepressivo induzido pelo $ZnCl_2$, foi mensurado o tempo de imobilidade dos camundongos no TSC (**Figuras I.4A, I.5A, I.6A, I.7A, I.8A, I.9A, I.10A**). Para excluir a possibilidade de que as alterações no tempo de imobilidade no TSC fossem devido a alguma interferência na atividade locomotora, foi mensurado o número de cruzamentos no TCA (**Figuras I.4B, I.5B, I.6B, I.7B, I.8B, I.9B, I.10B**).

Os resultados apresentados na **Figura I.4A** apontam que o efeito anti-imobilidade do $ZnCl_2$ (10 mg/kg, p.o.) ($p < 0,01$) foi completamente impedido pelo tratamento dos animais com o inibidor da PKA H-89 (1 μ g/sítio, i.c.v.). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com H-89 [F (1,28)=4,38, $p < 0,05$], $ZnCl_2$ [F (1,28)=8,32, $p < 0,01$] e da interação entre H-89 x $ZnCl_2$ [F (1,28)=4,71, $p < 0,05$] para o tempo de imobilidade. Análise de *post hoc* indicou que o tratamento com H-89 impediu a diminuição no tempo de imobilidade produzido pelo $ZnCl_2$ no TSC. A **Figura I.4B** mostra que a administração de H-89 e/ou $ZnCl_2$ (sozinhos ou em combinação) não alterou a locomoção no TCA. A ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo do tratamento com H-89 [F (1,28)=0,28, $p = 0,60$], $ZnCl_2$ [F (1,28)=0,29, $p = 0,59$] e interação entre H-89 x $ZnCl_2$ [F (1,28)=2,29, $p = 0,14$] para o número de cruzamentos.

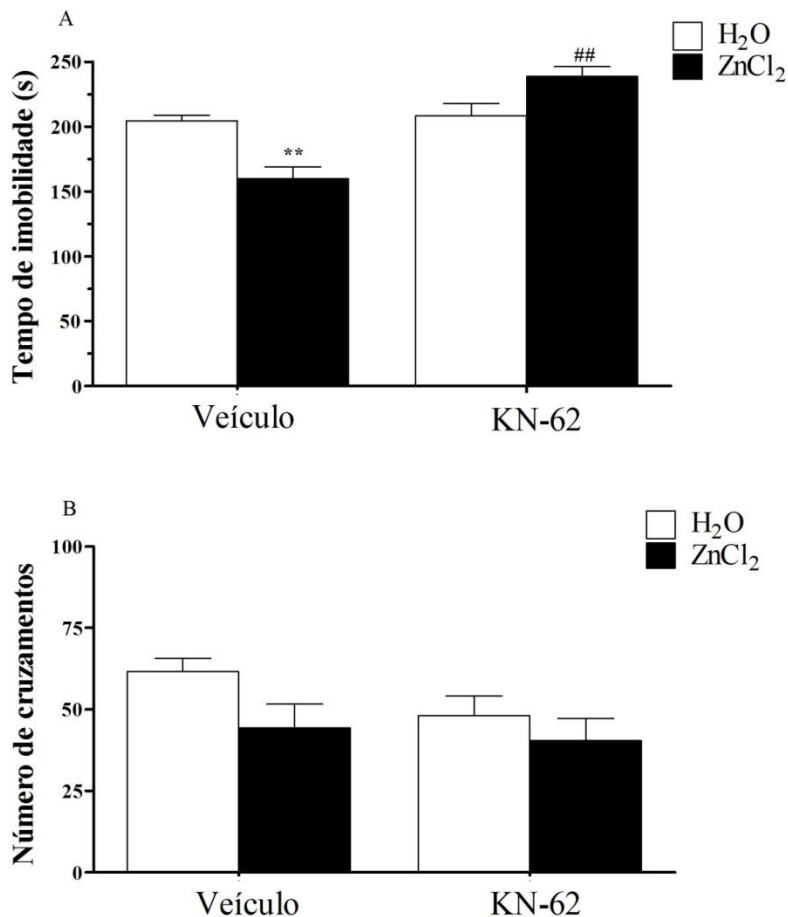
Figura I.4. Influência da inibição da PKA nos efeitos do ZnCl₂ no TSC e TCA



Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) e/ou H-89 (inibidor da PKA; 1 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). **p<0,01 comparado com controle (H₂O + Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo tratado com ZnCl₂+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls). Abreviatura: PKA, proteína cinase A; ZnCl₂, cloreto de zinco.

Como apresentado na **Figura I.5A**, o comportamento tipo-antidepressivo do ZnCl_2 (10 mg/kg, p.o.) ($p < 0,01$) foi impedido pelo inibidor da CAMKII KN-62 (1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o tratamento com KN-62 [$F(1,28) = 27,47$, $p < 0,01$], nenhum efeito para o tratamento com ZnCl_2 [$F(1,28) = 0,84$, $p > 0,05$] e um efeito significativo para a interação entre KN-62 x ZnCl_2 [$F(1,28) = 22,57$, $p < 0,01$] para o tempo de imobilidade. A análise de *post hoc* revelou que o efeito anti-imobilidade do ZnCl_2 foi completamente impedido pelo tratamento com KN-62. Nenhuma alteração na atividade locomotora no TCA foi observada (**Figura I.5B**): (Tratamento com KN-62 [$F(1,24) = 1,97$, $p = 0,17$], ZnCl_2 [$F(1,24) = 3,99$, $p = 0,06$] e interação entre KN-62 x ZnCl_2 [$F(1,24) = 0,61$, $p = 0,44$]).

Figura I.5. Influência da inibição da CAMKII nos efeitos do ZnCl₂ no TSC e TCA

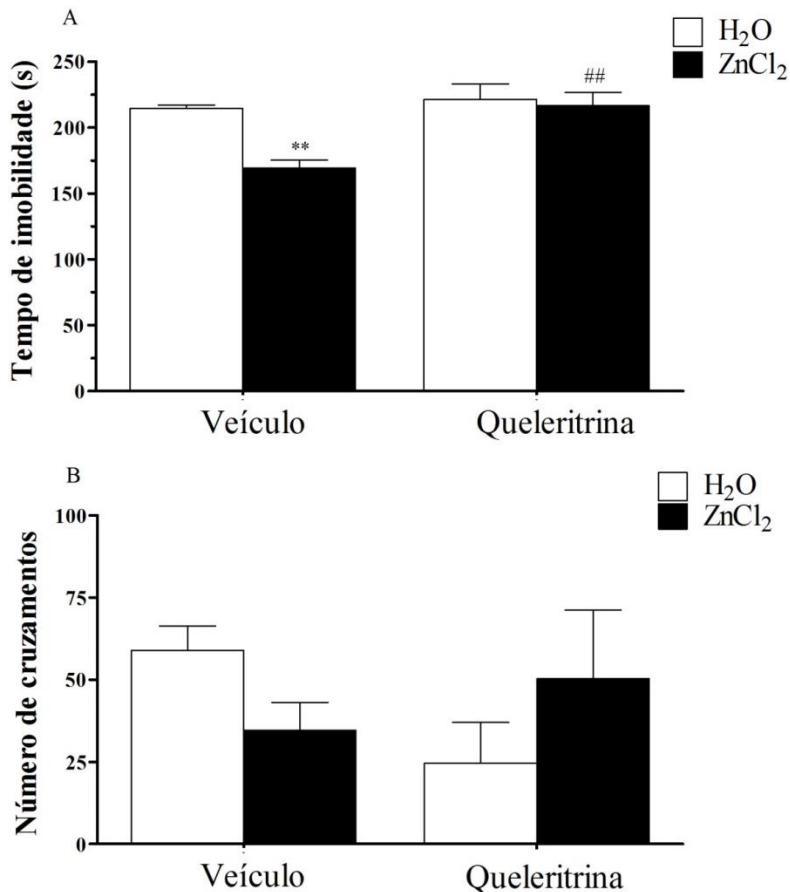


Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) e/ou KN-62 (inibidor da CAMKII; 1 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). **p<0,01 comparado com controle (H₂O + Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo tratado com ZnCl₂+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls). Abreviatura: CAMKII, proteína cinase dependente de Ca²⁺/calmodulina; ZnCl₂, cloreto de zinco.

A **Figura I.6A** mostra a influência do tratamento de camundongos com inibidor da PKC queleritrina (1 µg/sítio, i.c.v.) no efeito anti-imobilidade exercido pelo ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) no TSC. Os resultados evidenciam que a queleritrina foi capaz de abolir o comportamento tipo-antidepressivo do ZnCl₂. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o tratamento com queleritrina [F (1,28)=10,58, p<0,01], ZnCl₂ [F (1,28)=8,99, p<0,01] e interação entre queleritrina x ZnCl₂ [F (1,28)=5,82, p<0,05] para o tempo de imobilidade. Análise de *post hoc* indicou que o tratamento com inibidor da PKC impediu a diminuição no tempo de imobilidade produzida pelo ZnCl₂ no TSC. Nenhum efeito na atividade locomotora no TCA foi observado (**Figura I.6B**). A ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo no tratamento da queleritrina [F (1,28)=0,48, p=0,49], ZnCl₂ [F (1,28)=0,00, p=0,96] e interação entre queleritrina x ZnCl₂ [F (1,28)=3,51, p=0,07] para o número de cruzamentos.

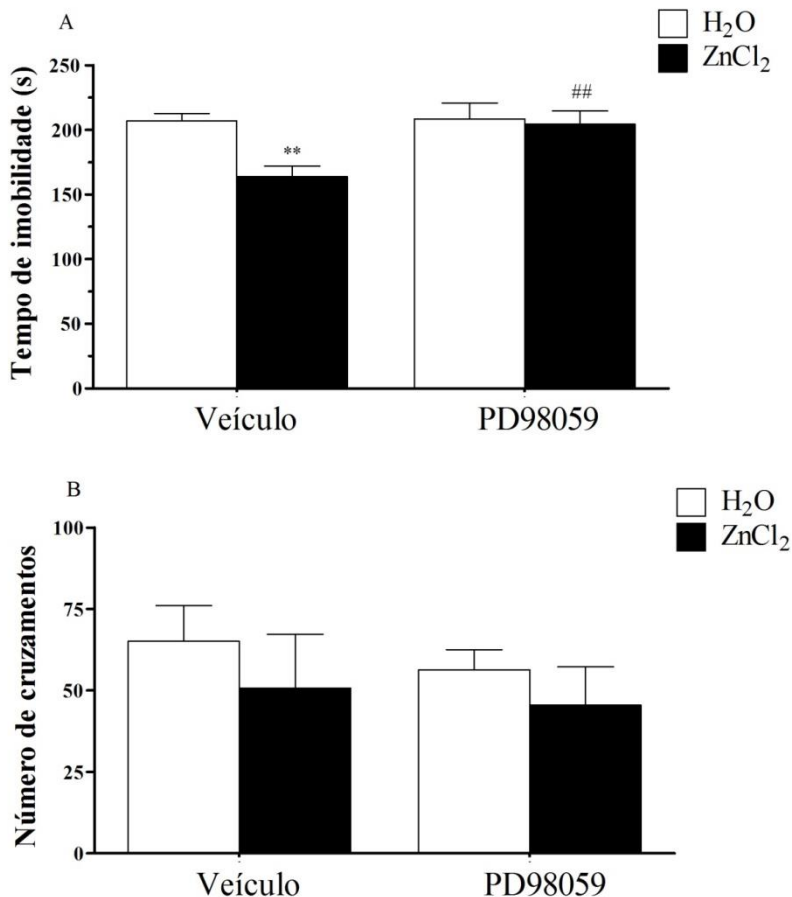
A **Figura I.7A** mostra a influencia do tratamento com inibidor da MEK1/2 PD98059 (5 µg/sítio, i.c.v.) no comportamento tipo-antidepressivo induzido pelo ZnCl₂. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para o tratamento com PD98059 [F (1,28)=4,91, p<0,05], ZnCl₂ [F (1,28)=6,22, p<0,05], e interação entre PD98059 x ZnCl₂ [F (1,28)=4,24, p<0,05]. Análise de *post hoc* indicou que ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) diminuiu o tempo de imobilidade no TSC (p<0,01), e que esse efeito foi bloqueado pelo tratamento com PD98059. Nenhum dos tratamentos causou mudança na atividade locomotora no TCA (**Figura I.7B**): (Tratamento com PD98059 [F (1,28)=0,34, p=0,56], ZnCl₂ [F (1,28)=1,11, p=0,30] e interação entre PD98059 x ZnCl₂ [F (1,28)=0,02, p=0,88]).

Figura I.6. Influência da inibição da PKC nos efeitos do ZnCl₂ no TSC e TCA



Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) e/ou quelerritrina (inibidor da PKC; 1 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). **p<0,01 comparado com controle (H₂O + Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo tratado com ZnCl₂+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls). Abreviatura: PKC, proteína cinase C; ZnCl₂, cloreto de zinco.

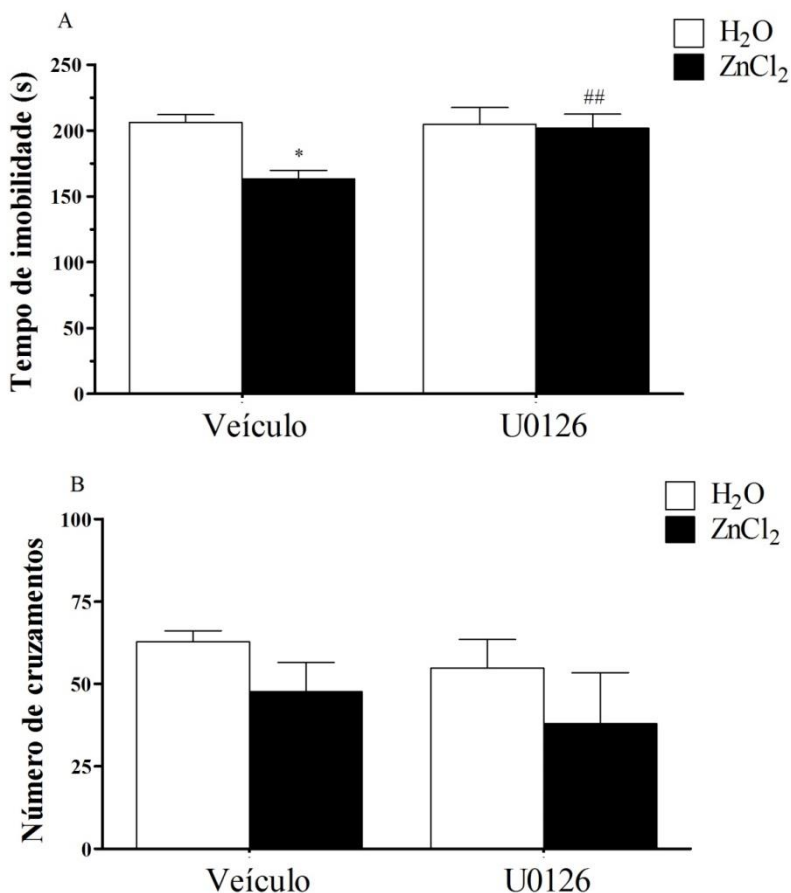
Figura I.7. Influência da inibição da MEK1/2 (usando o PD98059) nos efeitos do ZnCl₂ no TSC e TCA



Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) e/ou PD98059 (inibidor da MEK1/2; 5 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). **p < 0,01 comparado com controle (H₂O + Veículo). ##p < 0,01 comparado com o grupo tratamento com ZnCl₂+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls). Abreviatura: MEK, ERK cinase; ZnCl₂, cloreto de zinco.

De forma similar, o tratamento com inibidor da MEK1/2 U0126 (5 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) também preveniu o efeito tipo-antidepressivo exercido pelo ZnCl_2 (**Figura I.8A**) (tratamento com U0126 [F (1,28)=4,03, $p>0,05$], ZnCl_2 [F (1,28)=6,08, $p<0,05$] e interação entre U0126 x ZnCl_2 [F (1,28)=4,65, $p<0,05$]). Como revelado por análise de *post hoc*, o tratamento com U0126 aboliu completamente o efeito anti-imobilidade do ZnCl_2 . Nenhum dos tratamentos causou mudanças na atividade locomotora no TCA (**Figura I.8B**) (tratamento U0126 [F (1,24)=0,02, $p=0,88$], ZnCl_2 [F (1,24)=3,97, $p=0,06$] e interação entre U0126 x ZnCl_2 [F (1,24)=0,46, $p=0,51$]).

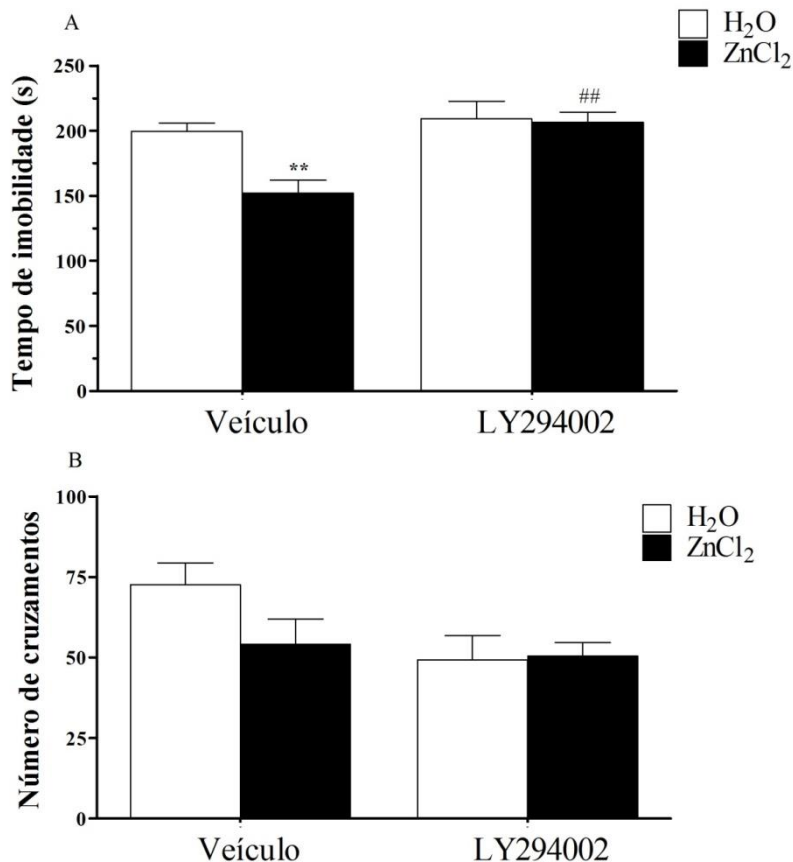
Figura I.8. Influência da inibição da MEK1/2 (usando o U0126) nos efeitos do ZnCl₂ no TSC e TCA



Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) e/ou U0126 (inibidor da MEK1/2; 5 µg/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). *p<0,05 comparado com controle (H₂O + Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo tratamento com ZnCl₂+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls). Abreviatura: MEK1/2, ERK cinase; ZnCl₂, cloreto de zinco.

Os resultados evidenciados na **Figura 1.9A** mostram que o comportamento tipo-antidepressivo do $ZnCl_2$ também foi influenciado pelo tratamento com inibidor da PI3K LY294002 (10 nmol/sítio, i.c.v.). A ANOVA de duas vias revelou diferenças significantes para o tratamento com LY294002 [F (1,28)=10,63, $p<0,01$], $ZnCl_2$ [F (1,28)=6,49, $p<0,05$] e interação entre LY294002 x $ZnCl_2$ [F (1,28)=5,15, $p<0,05$]. Análise de *post hoc* indicou que $ZnCl_2$ (10 mg/kg, p.o.) diminuiu o tempo de imobilidade ($p<0,01$) e que isso foi bloqueado pelo LY294002. Nenhum dos tratamentos causou alteração na atividade locomotora (**Fig. 1.9B**) (Tratamento com LY294002 [F (1,25)=3,89, $p=0,06$], $ZnCl_2$ [F (1,25)=1,59, $p=0,22$] e interação entre LY294002x $ZnCl_2$ [F(1,25)=2,05, $p=0,17$]).

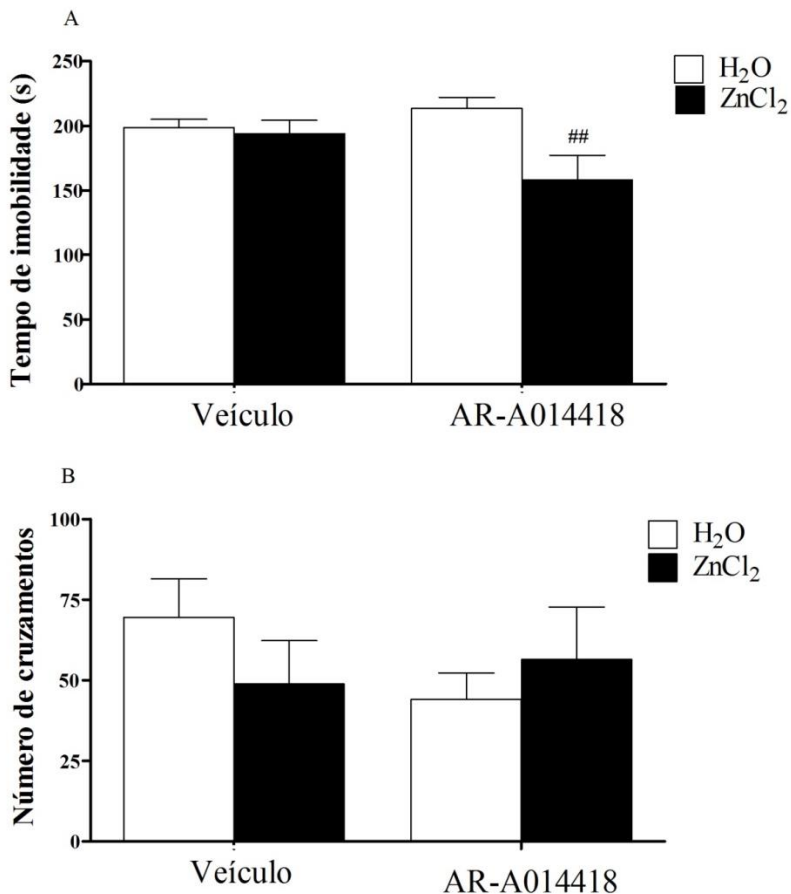
Figura I.9. Influência da modulação da PI3K nos efeitos do $ZnCl_2$ no TSC e TCA



Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com $ZnCl_2$ (10 mg/kg, p.o.) e/ou LY294002 (inibidor da PI3K; 10 nmol/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. ($n = 7-8$). ** $p < 0,01$ comparado com controle ($H_2O + Veículo$). ## $p < 0,01$ comparado com o grupo tratamento com $ZnCl_2 + Veículo$ (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls). Abreviatura: PI3K, fosfatidilinositol 3 cinase; $ZnCl_2$, cloreto de zinco.

A **Figura I.10A** mostra que a administração de dose subativa de ZnCl_2 (1 mg/kg, p.o.) em combinação com dose subativa de inibidor da $\text{GSK-3}\beta$ AR-A014418 (0,001 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) produziu um efeito anti-imobilidade sinérgico no TSC ($p < 0,05$): (Tratamento com AR-A014418 [F (1,26)=0,81, $p > 0,05$], ZnCl_2 [F (1,26)=6,70, $p < 0,05$] e interação entre AR-A014418 x ZnCl_2 [F (1,26)=4,84, $p < 0,05$]). Como revelado pela análise de *post hoc*, AR-A014418, administrado em uma dose que *per se* não produz efeito significativo no TSC, produziu um efeito sinérgico no TSC quando combinado com dose subativa de ZnCl_2 . A **Figura I.10B** mostra que esse efeito não foi devido a um efeito psicoestimulante, já que nenhum dos tratamentos afetou a atividade locomotora no TCA (Tratamento com AR-A014418 [F (1,26)=0,51, $p = 0,48$], ZnCl_2 [F (1,26)=0,11, $p = 0,75$] e interação entre AR-A014418 x ZnCl_2 [F (1,26)=1,74, $p = 0,20$]).

Figura I.10. Influência da modulação da GSK-3 β nos efeitos do ZnCl₂ no TSC e TCA

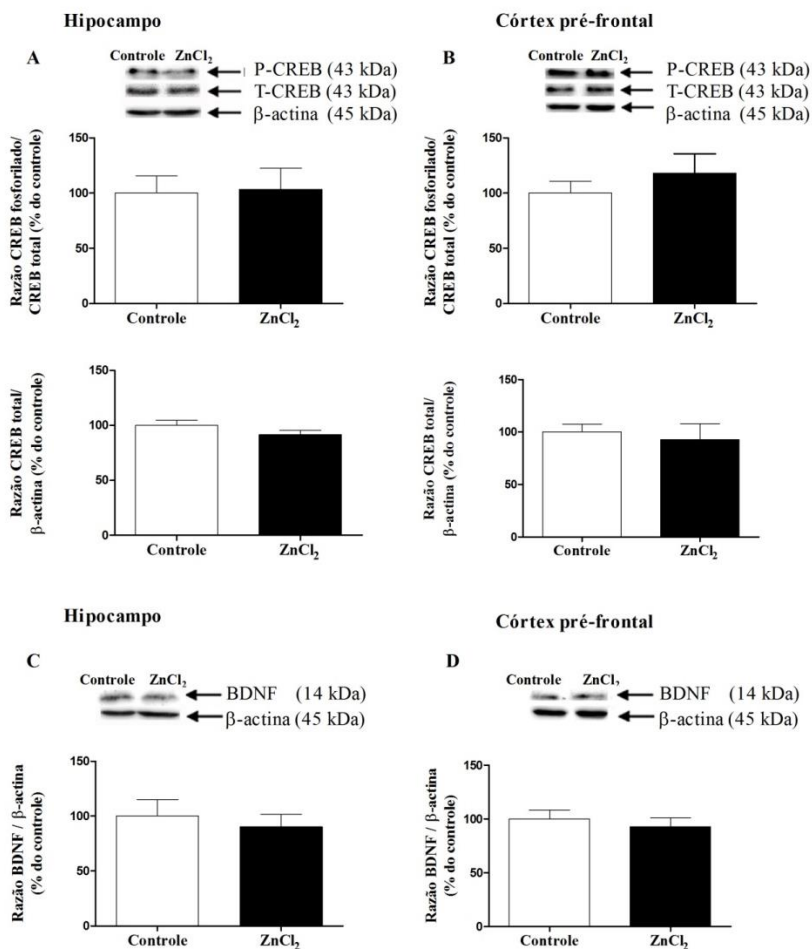


Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com dose subefetiva de ZnCl₂ (1 mg/kg, p.o.) e/ou AR-A014418 (inibidor da GSK-3 β ; 0,001 μ g/sítio; i.c.v.) no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e no número de cruzamentos no TCA (painel B). As barras representam a média + E.P.M. (n = 7-8). **p<0,01 comparado com controle (H₂O + Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo tratamento com ZnCl₂+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls). Abreviatura: GSK-3 β , glicogênio sintase cinase 3 β ; ZnCl₂, cloreto de zinco.

2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A **Figura I.11** mostra um Western blotting representativo da fosforilação do CREB no hipocampo e córtex pré-frontal (painéis A e B, respectivamente) e do imunoc conteúdo do BDNF (maduro) no hipocampo e córtex pré-frontal (painéis C e D, respectivamente) de camundongos tratados com $ZnCl_2$ (10 mg/kg). Análise densitométrica revelou que a fosforilação do CREB não foi afetada nem no hipocampo e nem no córtex pré-frontal (painéis A e B, respectivamente) (hipocampo [$t(12)=-0,14$, $p=0,89$] e córtex pré-frontal [$t(12)=0,19$, $p=0,85$]) (teste t de Student). De forma similar, nenhuma alteração no imunoc conteúdo do BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal (painéis C e D, respectivamente) (hipocampo [$t(12)=0,41$, $p=0,69$] e córtex pré-frontal [$t(6)=0,60$, $p=0,57$]) foi observada em qualquer grupo experimental (teste t de Student).

Figura I.11. Fosforilação do CREB e imunoc conteúdo do BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal 60 min após a administração de $ZnCl_2$



Legenda: Painéis A e B: Efeito do tratamento com $ZnCl_2$ (10 mg/kg, p.o.) no fosforilação do CREB no hipocampo (painel A) e no córtex pré-frontal (painel B). Uma imagem representativa e uma análise quantitativa normalizada para a banda do CREB total são mostradas. Os níveis da fosforilação do CREB determinadas pela razão da DO da banda fosforilada sobre a DO da banda total é expressa como percentual do controle. O imunoc conteúdo do CREB foi determinado pela relação

entre a DO dessa proteína / DO da β -actina (médias + E.P.M. de 7-8 camundongos; teste t de Student). Painéis C e D: Efeito do tratamento com $ZnCl_2$ (10 mg/kg, p.o.) no imunocónteuído de BDNF no hipocampo (painel C) e córtex pré-frontal (painel D). Uma imagem representativa e a análise quantitativa normalizada pela banda da β -actina são mostradas. Os resultados são expressos como percentual do controle (média + E.P.M. de 4-8 camundongos; teste t de Student). Abreviaturas: CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; $ZnCl_2$, cloreto de zinco.

3 DISCUSSÃO

Neste capítulo foi demonstrado que a administração de inibidores de várias cinases, especificamente inibidor da PKA H-89, inibidor da CAMKII KN-62, inibidores da MEK1/2 PD98059 e U0126, inibidor da PKC queleritrina, e inibidor da PI3K LY294002 aboliram o efeito tipointidepressivo do $ZnCl_2$ no TSC em camundongos. Além disso, também foi demonstrado que a coadministração de doses subefetivas do $ZnCl_2$ com inibidor da GSK-3 β AR-A014418 propiciou um efeito sinérgico no TSC. Entretanto, a fosforilação do CREB e o imunocónteuído do BDNF não foram alterados nem no hipocampo e nem no córtex pré-frontal 60 minutos após a administração com $ZnCl_2$ em camundongos.

Um grande esforço tem sido feito na busca de terapias adjuvantes que podem ajudar no tratamento da depressão. Um dos nutrientes que tem recebido atenção especial é o zinco. Ele tem muitas funções importantes ao organismo, já que mais de 300 enzimas foram identificadas como sendo dependentes desse metal (MCCALL, HUANG e FIERKE, 2000) e aproximadamente 2.000 fatores de transcrição requerem zinco para a expressão de seus genes (PRASAD, 2012). Notavelmente, o zinco pode interferir com as cascatas de sinalização intracelular. Algumas das proteínas que podem ser moduladas pelo zinco são: CaMKII (LENGYEL *et al.*, 2000), PKC (BEYERSMANN e HAASE, 2001), GSK-3 (ILOUZ *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2009), Akt (LEE *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2012), ERK (PARK *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2008), PI3K (LIANG *et al.*, 2012) e BDNF (FRANCO *et al.*, 2008; MLYNIEC *et al.*, 2013b). No entanto, a maioria destas ações foi estudada em tecidos periféricos, enquanto que os efeitos do zinco nas vias de sinalização no encéfalo ainda não estão totalmente estabelecidos.

O zinco é amplamente distribuído no SNC, sendo abundante no neocórtex, estriado, hipocampo e amígdala (PAOLETTI *et al.*, 2009).

No encéfalo, o zinco está na forma iônica (Zn^{2+}), é amplamente encontrado em terminais nervosos glutamatérgicos e é crucial para a atividade neuronal (SENSI *et al.*, 2009). O papel do zinco na depressão tem sido extensivamente estudado e já existem várias revisões sobre o assunto (NOWAK, SZEWCZYK e PILC, 2005; SZEWCZYK *et al.*, 2008; SZEWCZYK, KUBERA e NOWAK, 2010; LAI *et al.*, 2012). Já é evidenciado, por exemplo, que os níveis séricos de zinco estão diminuídos em pacientes depressivos, e que existe um aumento gradual nas suas concentrações séricas após o tratamento com antidepressivo (SIWEK *et al.*, 2010). Além disso, uma ingestão dietética diminuída de zinco é associada com uma maior incidência de depressão em homens e mulheres de duas coortes Australianas (VASHUM *et al.*, 2014). Por outro lado, a suplementação com zinco reduz os escores de depressão e facilita o tratamento desse transtorno em pacientes resistentes ao tratamento com antidepressivo (SIWEK *et al.*, 2009). Aliado a esse contexto, estudos pré-clínicos corroboram a noção de que o zinco possui propriedades antidepressivas, mostrando que esse íon metálico produz efeito tipo-antidepressivo em diversos modelos animais de depressão (NOWAK *et al.*, 2003b; CUNHA *et al.*, 2008; SOWA-KUCMA *et al.*, 2008) e induz um efeito sinérgico com os antidepressivos utilizados na clínica (CUNHA *et al.*, 2008).

Os mecanismos implicados no efeito tipo-antidepressivo do zinco envolvem, pelo menos em parte, a interação com o sistema serotoninérgico (SZEWCZYK *et al.*, 2009) e inibição dos receptores NMDA (ROSA *et al.*, 2003). Além disso, o zinco pode interagir com GPR39 (MLYNIEC *et al.*, 2013b), um receptor acoplado a proteína G que, quando ativado, pode estimular PKA, PKC, CAMK e MAPK (POPOVICS e STEWART, 2011). Assim, a ativação do receptor GPR39 pode culminar com a ativação do CREB (HOLST *et al.*, 2004) e com um conseqüente aumento do BDNF (ALBONI *et al.*, 2011). Também já foi demonstrado que camundongos que receberam uma dieta deficiente em zinco por 6 semanas apresentaram uma redução no GPR39 (em 53%) e na expressão proteica do BDNF (em 49%) no córtex pré-frontal (MLYNIEC *et al.*, 2013b). No entanto, a compreensão global dos mecanismos intracelulares envolvidos no efeito antidepressivo do zinco requer mais estudos.

A resposta aos antidepressivos tem sido atribuída à ativação ou inibição de vias de sinalização intracelular (NICIU *et al.*, 2013). Portanto, este capítulo buscou investigar se a inibição de vias de sinalização *upstream* ao BDNF e relacionada com neuroplasticidade,

neurogênese e sobrevivência celular poderiam influenciar no efeito antidepressivo do zinco no TSC.

A estimulação de vários receptores acoplados a proteína G podem ativar a adenilil ciclase, que converte o trifosfato de adenosina em AMPc. O aumento da atividade da PKA, como uma consequência deste evento, está implicado na resposta antidepressiva (ALMEIDA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2012; NICIU *et al.*, 2013) e na neurogênese hipocampal induzida pelos antidepressivos (ANACKER *et al.*, 2011). Em conformidade com esses dados, uma redução na atividade da PKA foi encontrada em fibroblastos de pacientes com depressão melancólica (SHELTON *et al.*, 1999). Digno de nota, os resultados desse capítulo mostram que a resposta tipo-antidepressiva do zinco (administrado 60 minutos antes do TSC) é dependente da sinalização celular modulada pela PKA, já que o efeito anti-imobilidade do zinco não foi observado em camundongos tratados com H-89. Vale salientar que a ativação da PKA também é implicada em algumas das ações periféricas do zinco (VON BULOW *et al.*, 2007; HAASE e RINK, 2009).

O papel da CAMKII na regulação de várias formas de neuroplasticidade e na fisiopatologia e tratamento dos transtornos de humor tem sido bem reportado (DU *et al.*, 2004). O tratamento crônico com inibidores seletivos da recaptação de serotonina tem demonstrado aumentar a autofosforilação e a atividade da CAMKII (TIRABOSCHI *et al.*, 2004). Em concordância, o inibidor da CAMKII previne o efeito comportamental de vários compostos antidepressivos em camundongos (ALMEIDA *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2014). Os dados do presente capítulo evidenciaram que o efeito tipo-antidepressivo do zinco foi prevenido pelo tratamento com KN-62, sugerindo que o efeito anti-imobilidade desse mineral no TSC é dependente da ativação da via da CAMKII. Este resultado está em parte de acordo com um estudo *in vitro* que mostra que o zinco pode ativar a CAMKII quando está em concentração baixa (LENGYEL *et al.*, 2000), mas é a primeira vez que se relata que esta via está envolvida na resposta comportamental do zinco no TSC.

Todas as isoenzimas da PKC são amplamente expressas no SNC, principalmente em regiões cerebrais envolvidas na regulação do humor (ABRIAL *et al.*, 2011). Estudo anterior já demonstrou que amostras do tecido pós-morte do córtex pré-frontal de pacientes que cometeram suicídio e que tinham histórico de depressão apresentavam uma diminuição na atividade da PKC (PANDEY *et al.*, 2004). Concordando com esses dados, a ativação da PKC tem sido associada com um comportamento tipo-antidepressivo (ZENI *et al.*, 2012). No presente

trabalho, o efeito tipo-antidepressivo do zinco foi abolido pela administração do inibidor da PKC queleritrina, sugerindo que a ativação da via de sinalização mediada pela PKC está envolvida, pelo menos em parte, no efeito tipo-antidepressivo do zinco. Isso corrobora dados da literatura que demonstram que o zinco pode ativar a PKC em tecidos periféricos (CSERMELY *et al.*, 1988; HAASE e RINK, 2009).

MAPK são importantes enzimas transdutoras de sinais envolvidas em muitos processos celulares, incluindo regulação de expressão de genes em resposta a estímulos extracelulares, proliferação celular, sobrevivência e morte celular, além da sua capacidade de modular a resposta à estresse físico e químico (CHANG e KARIN, 2001). Dados da literatura demonstram que a inibição da MEK induz a um efeito tipo-depressivo e previne a ação de alguns antidepressivos em camundongos (DUMAN *et al.*, 2007; REUS *et al.*, 2014). Além disso, comportamento tipo-depressivo induzido pela corticosterona em camundongos é associado com uma redução da fosforilação da ERK1/2 (GOURLEY *et al.*, 2008). Em tecido pós-morte de humanos com depressão, foi demonstrado um aumento na expressão da MKP-1, um regulador negativo da MAPK (DURIC *et al.*, 2010). Os resultados do presente trabalho evidenciam que a ativação da via da MEK/ERK está implicada no efeito tipo-antidepressivo agudo do zinco, considerando que o efeito anti-imobilidade do zinco no TSC foi abolido pelo PD98059 e U0126, que são inibidores da MEK1/2. A modulação desta via de sinalização pelo zinco também foi reportada por outros estudos: a) zinco aumentou a fosforilação da ERK1/2 em células de neuroblastomas (AN *et al.*, 2005); b) tratamento crônico com $ZnCl_2$ aumentou a fosforilação da ERK no córtex cerebral de ratos (FRANCO *et al.*, 2008); c) fosforilação da ERK aumentou com a suplementação de zinco e diminuiu quando o zinco sináptico foi eliminado (BESSER *et al.*, 2009; SINDREU, PALMITER e STORM, 2011); d) zinco ativou receptores TrkB, ocasionando a ativação da Akt e ERK1/2 (HUANG e MCNAMARA, 2010).

A ativação da PI3K, que catalisa a produção do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, induz a ativação da Akt (CANTLEY, 2002). Tem sido demonstrado que a via da PI3K/Akt modula vias de sinalização intracelular, incluindo GSK-3 β . É bem estabelecido que a esta enzima pode sofrer fosforilação (resíduo Ser9) pela Akt, que leva a sua inativação (BEAULIEU, GAINETDINOV e CARON, 2009). Anormalidades na via da PI3K/Akt/GSK-3 β estão implicadas nos transtornos depressivos. Também tem sido demonstrado que o córtex pré-frontal e o hipocampo de pacientes suicidas que tinham depressão

tem uma diminuição na ativação da PI3K (DWIVEDI *et al.*, 2008). Além disso, a inibição da GSK-3 β parece estar associada com o efeito antidepressivo de alguns compostos (BEAULIEU *et al.*, 2008; ROSA *et al.*, 2008) e inibidores da GSK-3 β parecem melhorar o efeito tipo-antidepressivo de alguns nutrientes como ácido fólico e ácido ascórbico (BUDNI *et al.*, 2011; MORETTI *et al.*, 2014). Os dois conjuntos de resultados obtidos nesse capítulo reforçam a noção de que essa via desempenha um papel essencial na modulação do humor: a) a reversão do efeito anti-imobilidade do zinco pelo inibidor da PI3K LY294002; b) o efeito anti-imobilidade observado no TSC quando doses subefetivas de ZnCl₂ e AR-A014418 foram combinadas. Esses dados indicam que o efeito tipo-antidepressivo do zinco envolve, pelo menos em parte, a ativação da PI3K/Akt e inibição da GSK-3 β . Além disso, esses resultados estão de acordo com outros estudos que mostram que algumas ações periféricas do zinco podem ser mediadas pela ativação da PI3K/Akt (LEE *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2012), e inativação da GSK-3 β (ILOUZ *et al.*, 2002; CHANOIT *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009).

A ativação da PKA, PKC, CAMKII ou MAPK podem levar a fosforilação e subsequente ativação do CREB (HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004). Além disso, a ativação da PI3K/Akt inibe GSK-3 β , prevenindo o efeito inibitório da GSK-3 β sobre o CREB, e assim, contribuindo para a ativação do CREB. Juntos, os resultados apresentados nesse primeiro capítulo indicam que a ação tipo-antidepressivo do zinco no TSC é dependente da PKA, PKC, CAMKII, ERK, PI3K/Akt/GSK-3 β , que são vias de sinalização que convergem para a ativação de CREB e subsequente aumento de BDNF. Esses achados estão de acordo com a literatura que demonstra que a deficiência de zinco leva a uma diminuição nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal (MLYNIIEC *et al.*, 2013b) e que o tratamento com hidroaspartato de zinco por 16 dias previne a redução induzida pelo estresse crônico imprevisível nos níveis de RNAm do BDNF no hipocampo de ratos (CIESLIK *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que, apesar do fato de que os estudos comportamentais indicarem que as vias de sinalização *upstream* ao BDNF estão envolvidos no efeito tipo-antidepressivo de zinco no TSC, este estudo não encontrou qualquer alteração na fosforilação do CREB e nem no imunocontéudo do BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos tratados de forma aguda com ZnCl₂ (60 minutos antes da decaptação). De acordo com esses resultados, a administração aguda de antidepressivos convencionais não é capaz de causar qualquer alteração nos níveis hipocampais e/ou cerebrocorticais do BDNF (Balu

et al., 2008). Por outro lado, foi reportado que o tratamento crônico com zinco, similar aos antidepressivos tradicionais (Balu et al., 2008; De Foubert et al., 2004) aumentou o RNAm e os níveis de proteína do BDNF no hipocampo (SOWA-KUCMA *et al.*, 2008; CIESLIK *et al.*, 2011) e córtex cerebral (NOWAK *et al.*, 2004) de ratos. Estudos clínicos também reportam que enquanto que a monoterapia do zinco (30 mg por 12 semanas) aumentou os níveis séricos de BDNF e diminuiu sintomas depressivos em pacientes com sobrepeso ou obesidade (SOLATI *et al.*, 2015), a suplementação com zinco (25 mg por 12 semanas) combinado com inibidor seletivo da recaptação de serotonina reduz sintomas depressivos, mas não altera os níveis de BDNF (RANJBAR *et al.*, 2014).

Por outro lado, a administração aguda com cetamina, um antagonista de receptor NMDA que exerce efeitos antidepressivos rápidos, aumentou os níveis de BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos (ZHOU *et al.*, 2014). Apesar da capacidade do zinco em agir como antagonista de receptor NMDA, sua administração aguda não foi capaz de ativar o CREB e nem de aumentar o conteúdo do BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal. Entretanto, não se pode excluir que alterações nestes parâmetros bioquímicos possam ocorrer em outro período de tempo ou em sub-regiões do córtex pré-frontal ou do hipocampo ou mesmo em diferentes tipos de células do SNC. É importante mencionar que o método de Western blotting não é capaz de discriminar tipos de células e sub-regiões que podem ser particularmente envolvidos no efeito antidepressivo. Portanto, estudos futuros utilizando abordagens adicionais, tais como imunohistoquímica podem permitir abordar esta questão.

4 CONCLUSÃO

Esse primeiro capítulo estende significativamente os dados da literatura a respeito dos mecanismos subjacentes a ação antidepressiva de zinco, investigando o papel de vias de sinalização celular envolvidas com a neuroplasticidade, neurogênese e sobrevivência celular em seu efeito no TSC. Esses dados indicam claramente que o efeito anti-imobilidade do zinco no TSC pode ser dependente da ativação das vias da PKA, CAMKII, ERK, PKC e PI3K/Akt, e da inibição da GSK-3 β .

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO PAPEL DA HO-1 NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ZINCO

Como já mencionado anteriormente nessa tese, alterações em vias de sinalização intracelular têm sido associadas com a depressão (TARDITO *et al.*, 2006). Dentre essas vias de sinalização intracelular, destaca-se a via do Nrf2/HO-1 (LEE *et al.*, 2013; MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). O Nrf2 é um fator de transcrição que induz a expressão de genes citoprotetores e de destoxificação (ex: glutationa S-transferase e aldo-ceto redutase) (CALKINS *et al.*, 2009; HAYES e DINKOVA-KOSTOVA, 2014). Entre as várias funções do Nrf2, é importante destacar seu papel na regulação das defesas antioxidantes celulares e resposta celular ao estresse, sendo importante para a homeostase redox e para proteção contra a morte celular programada (JOHNSON *et al.*, 2008).

Dentre as proteínas traduzidas como consequência da ativação do Nrf2, destaca-se a HO (SCHIPPER, 2000; RYTER e CHOI, 2015). Existem duas formas catalíticas ativas da HO, a forma induzível (HO-1) e a forma constitutiva (HO-2) (MAINES, TRAKSHEL e KUTTY, 1986; TRAKSHEL, KUTTY e MAINES, 1988). HO-1 é a enzima limitante envolvida na degradação do heme para gerar monóxido de carbono, ferro e biliverdina (SCHIPPER, 2000; RYTER e CHOI, 2015). É importante destacar que várias vias de sinalização podem levar a ativação do Nrf2, incluindo a ERK (MENG *et al.*, 2013), PI3K (NAKASO *et al.*, 2003), Akt (KORMOSH, LAKTIONOV e ANTOSHECHKINA, 2006; ZOU *et al.*, 2013) e PKC (ZHANG *et al.*, 2013a). Digno de nota, essas vias de sinalização também estão envolvidas na fisiopatologia e tratamento da depressão e culminam no aumento do BDNF (HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004; MALBERG e BLENDY, 2005) e estão envolvidas no efeito tipo-antidepressivo do zinco, conforme mostrado no Capítulo I.

Além disso, já é bem sabido que o BDNF é uma neurotrofina que está envolvida na fisiopatologia da depressão (LEE *et al.*, 2007; LEE e KIM, 2010) e que o tratamento crônico com antidepressivos leva a um aumento nos níveis de BDNF hipocampal (CHEN *et al.*, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2003; SEN, DUMAN e SANACORA, 2008). Vale ressaltar que as funções do BDNF são mediadas por receptores específicos, tais como o receptor TrkB (MELLSTROM *et al.*, 2004).

Levando em consideração que os antidepressivos clássicos possuem algumas limitações (RUHE *et al.*, 2011; BET *et al.*, 2013),

nutracêuticos, incluindo o zinco, tem sido propostos como uma estratégia para melhorar o tratamento da depressão (MANOSSO, MORETTI e RODRIGUES, 2013). Vários estudos pré-clínicos (CUNHA *et al.*, 2008; SZEWCZYK *et al.*, 2015) e clínicos (SIWEK *et al.*, 2009; SOLATI *et al.*, 2015) demonstram o benefício no zinco na depressão. Embora ainda haja muito a ser descoberto sobre os mecanismos subjacentes ao efeito antidepressivo do zinco, a redução do estresse oxidativo (BROCARDI *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2008) e a ativação de vias de sinalização envolvidas no aumento do BDNF são alguns dos mecanismos de ação que tem sido proposto para o efeito tipo-antidepressivo do zinco (SOWA-KUCMA *et al.*, 2008; MLYNIEC *et al.*, 2013b). Além disso, o zinco pode estimular a biossíntese da glutatona (importante antioxidante endógeno) a partir de um mecanismo dependente de Nrf2, pelo menos em células endoteliais (CORTESE *et al.*, 2008). Sendo assim, esse capítulo teve como objetivo investigar se a HO-1 e o receptor de BDNF estão envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do zinco.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 ANIMAIS

Camundongos *Swiss* fêmeas (45-55 dias, pesando 30-45 g) foram mantidas em condição padrão de biotério (20-22°C), com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas (luz acesa às 7:00h). Os animais foram alocados em grupos de 15 em um caixa com 41×34×16 cm. Os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00h e 16:00h. Os animais foram aclimatizados na sala de experimentação pelo menos 12 horas antes dos testes comportamentais. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° PP00795 – **Anexo A**). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e para reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

1.2 COMPOSTOS E TRATAMENTOS

Os seguintes compostos foram utilizados: ZnCl₂ (1 ou 10 mg/kg), protoporfirina de cobalto (CoPP – 0,01 µg/sítio, indutor da HO-1) protoporfirina de zinco (ZnPP - 10 µg/sítio, inibidor da HO-1) e K-252a (1 µg/sítio, antagonista do receptor TrkB). Todos os compostos foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA e foram preparados logo antes do tratamento. ZnCl₂ foi dissolvido em água destilada e administrado via oral por gavagem em um volume constante de 10

ml/kg. ZnPP, CoPP e K-252a foram dissolvidos em uma concentração final de 0,1% DMSO (para ZnPP e CoPP) ou 30% (para K-252a) e administrados via i.c.v., em um volume de 5 μ l por camundongo. Os grupos tratados com o veículo apropriado também foram avaliados simultaneamente.

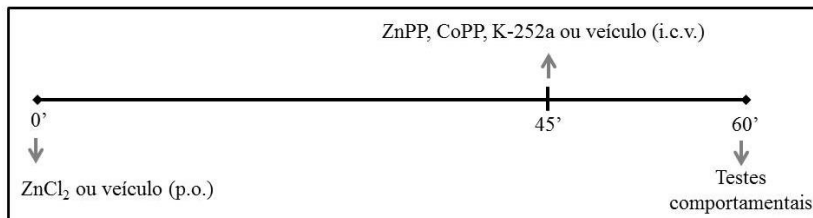
A administração i.c.v. foi realizada de acordo como descrito anteriormente no item 1.2 do capítulo I.

Para investigar o envolvimento da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do ZnCl₂ no TSC, os camundongos receberam uma dose ativa de ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) ou veículo e após 45 min eles foram tratados com o inibidor da HO-1 ZnPP (10 μ g/sítio, i.c.v.) ou veículo. Em outro experimento, camundongos foram tratados com dose subativa de ZnCl₂ (1 mg/kg, p.o.) ou veículo e 45 min depois, receberam uma dose subefetiva do indutor da HO-1 CoPP (0,01 μ g/sítio, i.c.v.) ou veículo. Todos os animais foram testados no TSC 15 min após a administração i.c.v.. Em seguida, os animais foram submetidos ao TCA para avaliação da atividade locomotora.

Para testar a hipótese de que o efeito tipo-antidepressivo do zinco é dependente da ativação dos receptores TrkB, os camundongos foram pré-tratados com dose ativa de ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) ou veículo e 45 min depois, foi administrado o antagonista do receptor TrkB K-252a (1 μ g/sítio, i.c.v.) ou veículo. Decorridos 15 min, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (TSC e TCA).

A **Figura II.1** mostra o diagrama do protocolo experimental.

As doses de ZnCl₂ usadas foram baseadas em experimentos prévios do laboratório (CUNHA *et al.*, 2008). As doses de ZnPP, CoPP e K-252a foram escolhidas com base em experimentos prévios do laboratório e de outros grupos de pesquisa (MORETTI *et al.*, 2014; WEI *et al.*, 2014; CUNHA *et al.*, 2015).

Figura II.1. Diagrama do protocolo experimental

Legenda: Camundongos *Swiss* fêmeas foram tratadas no tempo 0 com ZnCl₂ ou veículo (água) via oral (p.o.). Decorridos 45 minutos, os animais receberam ZnPP, CoPP, K-252a ou veículo (salina) via i.c.v.. 15 minutos depois, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Abreviaturas: CoPP, protoporfirina de cobalto; i.c.v., intracerebroventricular; p.o., *per os*; ZnCl₂, cloreto de zinco; ZnPP, protoporfirina de zinco.

1.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

1.3.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

O TSC foi realizado conforme descrito anteriormente (item 1.3.1 do capítulo 1).

1.3.2 Teste do campo aberto (TCA)

O TCA foi realizado conforme descrito anteriormente (item 1.3.2 do capítulo 1).

1.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para as análises de Western blotting, um grupo independente de animais foi tratado com ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o., dose ativa no TSC) ou veículo e 1 h após, os camundongos foram decapitados e o córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecados.

1.4.1 Preparação do tecido

Após a decapitação, o encéfalo de cada animal foi removido e o córtex pré-frontal e hipocampo foram rapidamente dissecados (4°C), colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. As amostras foram preparadas e a dosagem de proteína foi feita como descrita anteriormente (item 1.4.1 do capítulo 1).

1.4.2 Western blotting

A mesma quantidade de proteína (60 µg por poço) para cada amostra foi separada por eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose usando um sistema de transferência a 40 mV e 216 mA por 90 min (ECL Semi-dry Blotters, Amersham Biosciences, England). Para verificar a eficiência da transferência, os géis foram corados com Coomassie blue e as membranas com Ponceau S.

Após essa etapa, as membranas resultantes foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-HO-1 (Santa Cruz, 1:500), que foi diluído em solução TBS contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T). A seguir, todas as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Cell Signaling, 1:5000) por 60 min. A imunoreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA) segundo especificações do fabricante. Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. Para verificar se a quantidade de proteína para cada um dos grupos experimentais foi a mesma, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-β-actina (Santa Cruz, 1:250) e com um anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Cell Signaling 1:5000).

A DO das bandas foi quantificada usando Image Lab software® (Bio-Rad Laboratories). O imunoconteúdo da HO-1 foi determinado pela relação entre a DO da HO-1 / DO da β-actina respectiva. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

1.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar o pressuposto de normalidade de dados comportamentais e bioquímicos. Todas as variáveis do presente estudo mostraram uma distribuição normal. Dessa forma, as diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas através de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Duncan (para as análises comportamentais) quando apropriado ou do teste t de Student (para as

análises de imunoblotting). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados estão expressos em média + erro padrão da média (E.P.M.).

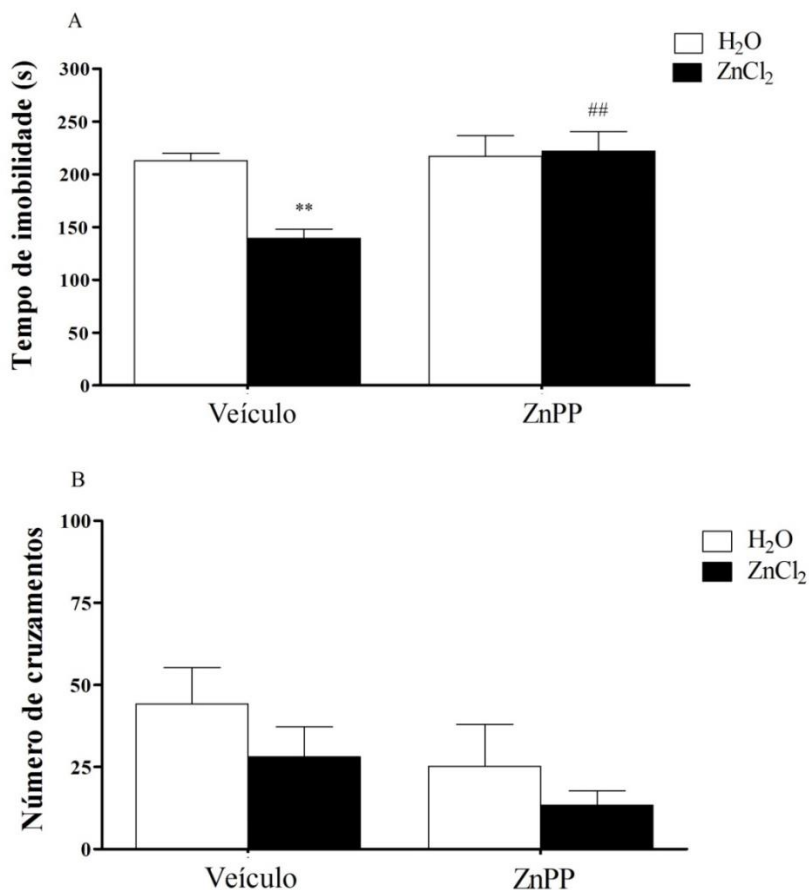
2 RESULTADOS

2.1 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Para verificar o envolvimento da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do $ZnCl_2$, o tempo de imobilidade dos camundongos no TSC foi mensurado (**Figuras II.2A, II.3A**). A fim de excluir a possibilidade de que alterações no tempo de imobilidade no TSC tenha sido ocasionado devido a alterações na atividade locomotora dos animais, o número de cruzamentos foi mensurado (**Figuras II.2B, II.3B**).

Os resultados da **Figura II.2A** evidenciam que o efeito anti-imobilidade do $ZnCl_2$ (10 mg/kg, p.o.) foi impedido pelo tratamento com inibidor da HO-1 ZnPP (10 μ g/sítio, i.c.v.). A ANOVA de duas vias mostrou uma diferença significativo do tratamento com ZnPP [$F(1,28)=8,98$, $p < 0,01$], $ZnCl_2$ [$F(1,28)=5,57$, $p < 0,05$] e da interação entre $ZnCl_2 \times ZnPP$ [$F(1,28)=7,27$, $p < 0,05$]. A análise de *post hoc* indicou que o tratamento com ZnPP bloqueou a diminuição no tempo de imobilidade produzido pelo $ZnCl_2$ no TSC ($p < 0,01$). A **Figura II.2B** demonstra que a administração de ZnPP sozinho ou em combinação com $ZnCl_2$ não causou qualquer efeito significativo no número de cruzamentos no TCA. A ANOVA de duas vias não revelou efeito significativo no tratamento com ZnPP [$F(1,28)=2,96$, $p=0,10$], $ZnCl_2$ [$F(1,28)=2,06$, $p=0,16$] e interação entre $ZnCl_2 \times ZnPP$ [$F(1,28)=0,05$, $p=0,83$] para o número de cruzamentos.

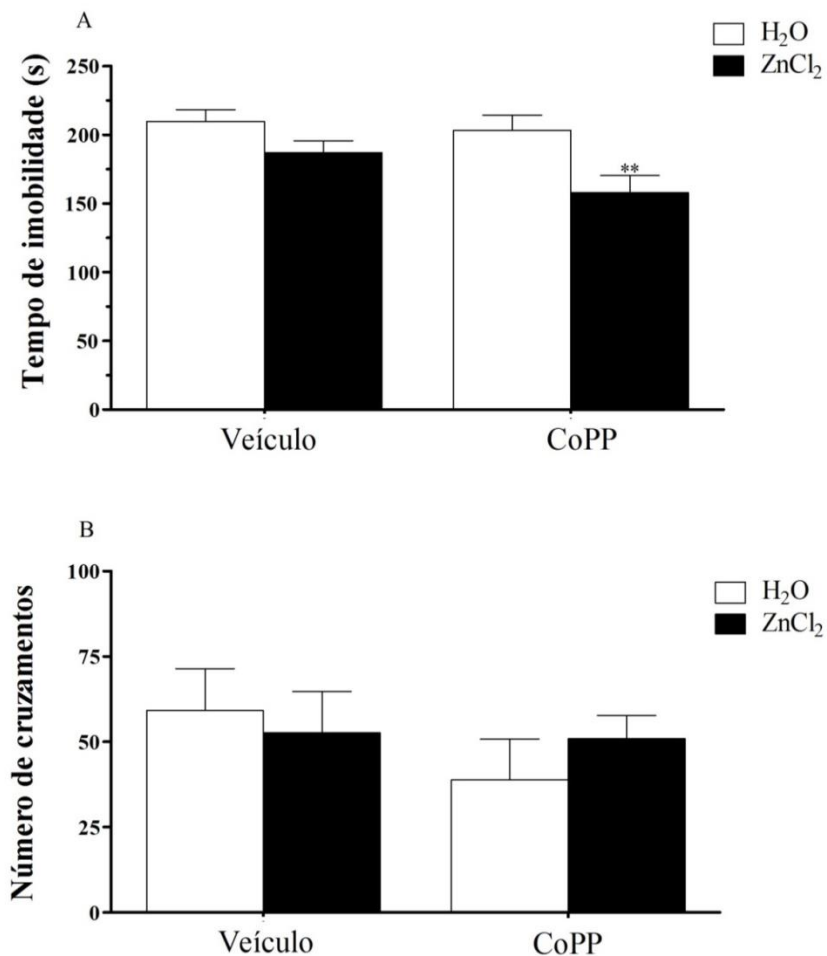
Figura II.2. Influência da inibição da HO-1 nos efeitos do ZnCl_2 no TSC e TCA



Legenda: Efeito do tratamento de camundongos com ZnPP (inibidor da HO-1; 10 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) no efeito tipo-antidepressivo induzido pelo ZnCl_2 (10 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). As barras representam média + E.P.M. (n = 8). ** $p < 0,01$ comparado com controle (H₂O + Veículo). ## $p < 0,01$ comparado com o grupo tratado com ZnCl_2 +Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan). Abreviaturas: HO-1, heme oxigenase 1; i.c.v., intracerebroventricular; ZnCl_2 , cloreto de zinco; ZnPP, protoporfirina de zinco.

Reforçando a noção de que a ativação da HO-1 está implicada na resposta comportamental do $ZnCl_2$ no TSC, os resultados ilustrados na **Figura II.3A** mostram que a administração de dose subefetiva de $ZnCl_2$ (1 mg/kg, p.o.) em combinação com dose subefetiva de CoPP (0,01 μ g/sítio, i.c.v.) produziu um efeito anti-imobilidade sinérgico no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o tratamento com $ZnCl_2$ [$F(1,28)=10,72$, $p<0,01$], mas não para o tratamento com CoPP [$F(1,28)=2,99$, $p=0,06$] e interação entre $ZnCl_2 \times$ CoPP [$F(1,28)=1,21$, $p=0,28$]. Como revelado pela análise de *post hoc*, a administração de CoPP em uma dose que não produz efeito tipo-antidepressivo no TSC, produziu um efeito sinérgico quando combinado com uma dose subefetiva de $ZnCl_2$ no TSC ($p<0,01$). A **Figura II.3B** demonstra que esse efeito não foi devido a um efeito psicoestimulante, já que a administração de $ZnCl_2$ e/ou CoPP não afetou a locomoção dos camundongos no TCA (tratamento com CoPP [$F(1,28)=0,99$, $p=0,33$], $ZnCl_2$ [$F(1,28)=0,06$, $p=0,80$] e interação entre $ZnCl_2 \times$ CoPP [$F(1,28)=0,70$, $p=0,41$]).

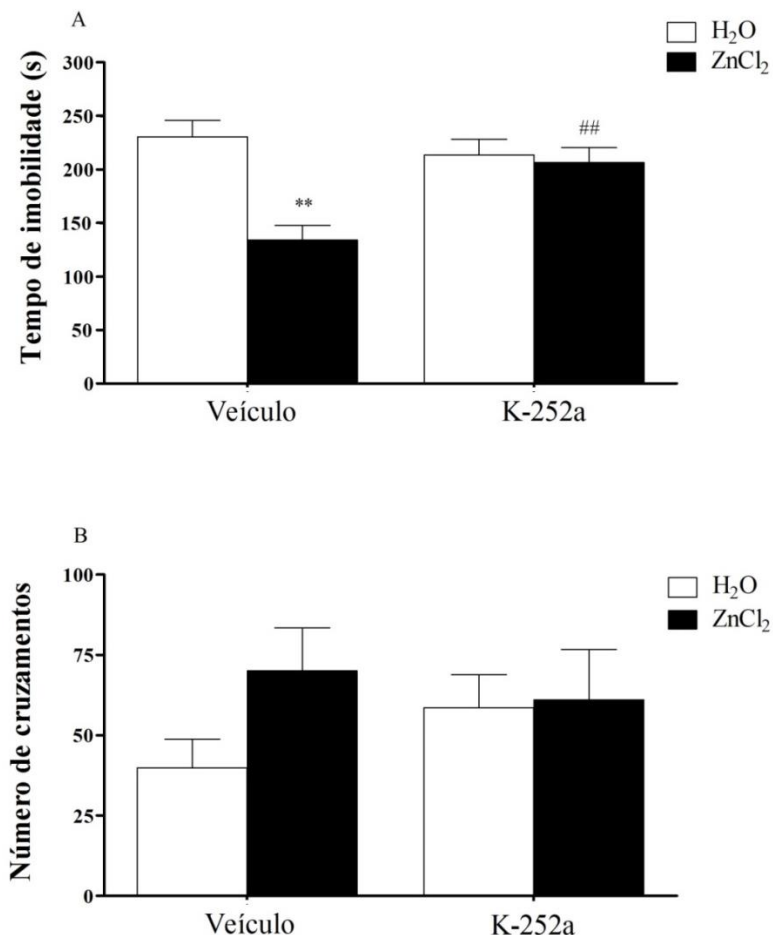
Figura II.3. Influência da indução da HO-1 nos efeitos do ZnCl_2 no TSC e TCA



Legenda: Efeito do tratamento de camundongos com CoPP (indutor da HO-1; 0,01 $\mu\text{g}/\text{sítio}$, i.c.v.) em combinação com dose subefetiva de ZnCl_2 (1 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). As barras representam média + E.P.M. (n = 8). ** $p < 0,01$ comparado com controle (H_2O + Veículo). (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan). Abreviaturas: CoPP, protoporfirina de cobalto; HO-1, heme oxigenase 1; i.c.v., intracerebroventricular; ZnCl_2 , cloreto de zinco.

A **Figura II.4A** mostra a influência do tratamento de camundongos com um antagonista do receptor TrkB K-252a (1 µg/sítio, i.c.v.) no efeito anti-imobilidade do ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significantes para o tratamento com ZnCl₂ [F(1,28)=12,89, p<0,01] e interação entre ZnCl₂ × K-252a [F(1,28)=9,53, p<0,01], mas não para o tratamento com K-252a [F(1,28)=3,71, p=0,06]. A análise *post hoc* indicou que o tratamento com K-252a aboliu a diminuição no tempo de imobilidade produzido pelo ZnCl₂ no TSC (p<0,01). Nenhum efeito na atividade locomotora no TCA foi observado (**Figura II.4B**). A ANOVA e duas vias não revelou nenhuma significância do tratamento com K-252a [F(1,28)=0,15, p=0,70], ZnCl₂ [F(1,28)=1,75, p=0,20] e interação entre ZnCl₂ × K-252a [F(1,28)=1,25, p=0,27] para o número de cruzamentos.

Figura II.4. Influência do receptor TrkB nos efeitos do ZnCl₂ no TSC e TCA

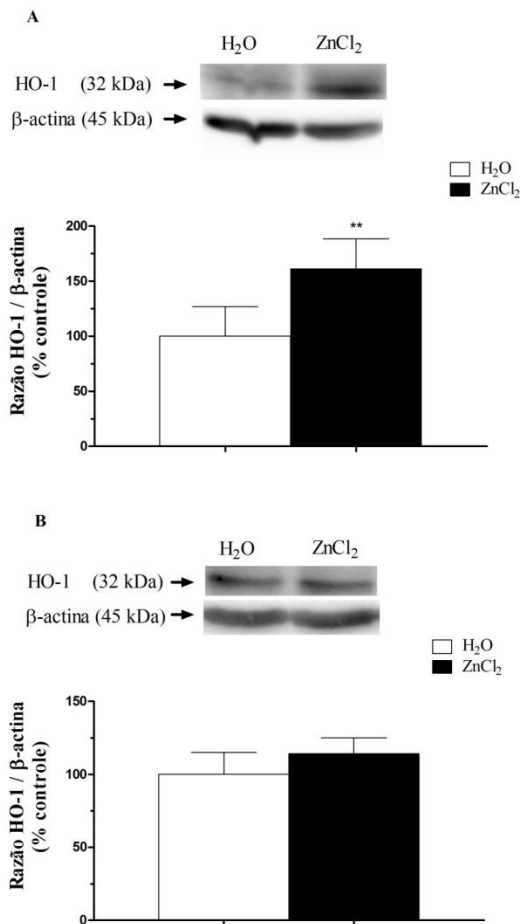


Legenda: Efeito do tratamento de camundongos com K-252a (antagonista de receptor TrkB; 1 µg/sítio, i.c.v.) no efeito tipo-antidepressivo induzido pelo ZnCl₂ (10 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). As barras representam média + E.P.M. (n = 8). **p<0,01 comparado com controle (H₂O + Veículo). ##p<0,01 comparado com o grupo tratado com ZnCl₂+Veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan). Abreviatura: i.c.v., intracerebroventricular; TrkB, receptor tropomiosina cinase B; ZnCl₂, cloreto de zinco.

2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A fim de enfatizar a importância da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do $ZnCl_2$, investigou-se o efeito do tratamento com $ZnCl_2$ no imunoconteúdo da HO-1 no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos. A **Figura II.5** mostra um Western blotting representativo do imunoconteúdo da HO-1 no córtex pré-frontal (painel A) e no hipocampo (painel B) de camundongos tratados com $ZnCl_2$ (10 mg/kg). A análise densitométrica revelou que a administração aguda de $ZnCl_2$ (60 min antes das análises) aumentou o imunoconteúdo da HO-1 no córtex pré-frontal (painel A) [$t(9)=-2,49$, $p<0,05$] (teste t de Student). Por outro lado, nenhuma mudança no imunoconteúdo da HO-1 foi observado no hipocampo (painel B) [$t(9)=-1,42$, $p=0,19$] (teste t de Student).

Figura II.5. Efeito do tratamento com $ZnCl_2$ no imunocontéudo da HO-1 no córtex pré-frontal e hipocampo



Legenda: Efeito do tratamento com $ZnCl_2$ (10 mg/kg, p.o.) no imunocontéudo da HO-1 no córtex pré-frontal (painel A) e no hipocampo (painel B). Uma imagem representativa e uma análise quantitativa normalizada pela banda da β -actina são mostradas. Os resultados são expressos como percentual do controle. As barras representam média + E.P.M. (n = 5-6). ** $p < 0,01$ comparado com controle (teste t de Student). Abreviaturas: HO-1, heme oxigenase-1; $ZnCl_2$, cloreto de zinco.

3 DISCUSSÃO

O efeito tipo-antidepressivo do zinco em roedores é bem estabelecido (ROSA *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2008; JOSHI *et al.*, 2012; SZEWCZYK *et al.*, 2015) e, apesar de já se saber que o zinco pode agir por um mecanismo dependente dos sistemas serotoninérgicos (CICHY *et al.*, 2009; SZEWCZYK *et al.*, 2009) e glutamatérgico (ROSA *et al.*, 2003; DOBOSZEWSKA *et al.*, 2014), ainda há muito a ser descoberto. O presente estudo proporciona evidências de que tanto a ativação da HO-1 e a inibição de receptores TrkB estão envolvidos no efeito anti-imobilidade de ZnCl₂ no TSC. Assim, o presente estudo contribui ainda mais para a compreensão dos mecanismos subjacentes aos efeitos do zinco no TSC.

A ativação da via Nrf2/HO-1 tem sido implicada na proteção de neurônios contra insulto isquêmico (TANAKA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2014) e na fisiopatologia da depressão. Foi demonstrado que a deleção do Nrf2 em camundongos resultou em um comportamento tipo-depressivo e diminuiu os níveis de dopamina e serotonina no córtex pré-frontal (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). Digno de nota, o efeito tipo-antidepressivo exercido pela agmatina foi abolido em camundongos *knockout* para Nrf2 (FREITAS *et al.*, 2015). Em concordância com esses achados, dados da literatura também demonstraram que animais submetidos a um modelo de depressão induzido por corticosterona apresentaram uma diminuição nos níveis de proteína Nrf2 no córtex cerebral e hipocampo e que, o tratamento crônico com fluoxetina, restaurou essas alterações (MENDEZ-DAVID *et al.*, 2015). Em humanos, uma diminuição nos níveis séricos de HO-1 tem sido reportada em pacientes depressivos (RYBKA *et al.*, 2013). No presente capítulo, foi demonstrado que o efeito anti-imobilidade do zinco é dependente da ativação da HO-1, já que a administração do inibidor da HO-1 ZnPP impediu os efeitos comportamentais desse metal. Além disso, a coadministração de doses subefetivas de ZnCl₂ e do indutor da HO-1 CoPP foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TSC. Corroborando esses achados, o inibidor da HO-1 ZnPP também impede o comportamento tipo-antidepressivo de outros agentes antidepressivos como ácido ascórbico (MORETTI *et al.*, 2013) e creatina (CUNHA *et al.*, 2015). Similar aos resultados do presente capítulo, CoPP também exerce efeito sinérgico quando administrado com doses subefetivas de ácido ascórbico (MORETTI *et al.*, 2013) e creatina (CUNHA *et al.*, 2015).

A HO também está relacionada com estresse oxidativo. Notavelmente, neurônios superexpressando HO-1 resistem à morte celular mediada pelo estresse oxidativo (CHEN, GUNTER e MAINES, 2000). A HO-1 também exibe efeito antiapoptótico contra a toxicidade glutamatérgica relacionada ao estresse em endotélio vascular encefálico (PARFENOVA *et al.*, 2006). É bem conhecido que tanto o estresse oxidativo (CHUNG *et al.*, 2013; BLACK *et al.*, 2015) quanto o aumento do glutamato causam excitotoxicidade (ZARATE *et al.*, 2010), um evento que contribui para o desenvolvimento dos sintomas depressivos. Por outro lado, estudos pré-clínicos sugerem que uma das razões pela qual o zinco exerce seu efeito tipo-antidepressivo é devido à modulação de enzimas antioxidantes (BROCARDO *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2008) e a regulação dos receptores ou transportadores envolvidos na neurotransmissão glutamatérgica (CICHY *et al.*, 2009; TAMANO *et al.*, 2009; DOBOSZEWSKA *et al.*, 2014).

Nesse capítulo também foi demonstrado um aumento no imunoconteúdo da HO-1 no córtex pré-frontal, mas não no hipocampo de camundongos seguido da administração aguda de zinco. Como mencionado previamente, a deleção do Nrf2 resultou em uma diminuição nos níveis de dopamina e serotonina e aumento nos níveis de glutamato no córtex pré-frontal, enquanto nenhuma mudança foi encontrada do hipocampo (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013). O ácido docosahexaenoico, um ácido graxo poli-insaturado que exerce efeitos antidepressivos, foi capaz de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias e aumentar a expressão da HO-1 em microglia BV-2 (células microgliais ativadas e imortalizadas). A desipramina, um antidepressivo tricíclico, também aumentou a expressão da HO-1 em microglia BV-2 e potencializou o efeito do ácido docosahexaenoico na expressão da HO-1 (LU *et al.*, 2010). Além disso, a indução da HO-1 pode contribuir para a defesa celular contra dano isquêmico no córtex cerebral, mas não no hipocampo (TAKIZAWA *et al.*, 1998). De acordo com estes resultados, no presente estudo o zinco aumentou o imunoconteúdo da HO-1 no córtex pré-frontal, mas não no hipocampo, sugerindo que HO-1 no córtex pré-frontal é mais sensível ao zinco. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que mudanças no imunoconteúdo da HO-1 possam ocorrer em outro tempo ou em sub-regiões do hipocampo ou mesmo em diferentes tipos de células do SNC.

É importante mencionar que as vias da PI3K/Akt e ERK regulam, pelo menos *in vitro*, a expressão da HO-1 (WU *et al.*, 2006; MO *et al.*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que a expressão da

HO-1 induzida pelo ácido docosahexaenoico é bloqueada com o uso de inibidores das vias da PI3K/Akt e ERK (LU *et al.*, 2010). Vale destacar que como demonstrado no capítulo I, bem como em outros dados da literatura (SZEWCZYK *et al.*, 2015), o efeito tipo-antidepressivo do zinco pode ser dependente da ativação das vias da PI3K/Akt e ERK. Esses dados reforçam a noção de que o zinco pode exercer seu efeito tipo-antidepressivo, pelo menos em parte, pela influência na via da HO-1.

A superexpressão da HO-1 pode proteger neurônios contra isquemia/reperfusão encefálica e está associada a um aumento nos níveis de BDNF e TrkB, além de um aumento na fosforilação da Akt. Por outro lado, o tratamento com o antagonista do receptor TrkB K-252a reverteu o aumento nos níveis do BDNF e na fosforilação da Akt induzido pela HO-1 (QI *et al.*, 2014). Há uma infinidade de evidências documentando que o BDNF é implicado na fisiopatologia dos transtornos depressivos e nos mecanismos envolvidos com as respostas dos antidepressivos (DUMAN e MONTEGGIA, 2006). Em consonância com isso, uma meta-análise indicou que os níveis séricos de BDNF estão diminuídos em pacientes depressivos (SEN, DUMAN e SANACORA, 2008). Além disso, camundongos BDNF^{+/-} exibiram aumento no tempo de imobilidade no TNF após estresse moderado (ADVANI, KOEK e HENSLER, 2009). Adicionalmente, a ablação dos receptores TrkB tornaram os camundongos insensíveis ao tratamento com antidepressivos (LI *et al.*, 2008). Levando-se em conta que o antagonista do receptor de TrkB K-252a impediu o comportamento tipo-antidepressivo induzido pelo zinco, uma possibilidade que deve ser considerada e testada em estudos futuros é que HO-1 pode ser um alvo implicado na modulação da sinalização do BDNF, e, conseqüentemente, na resposta antidepressiva e que ambos (HO-1 e BDNF) estejam envolvidos nos efeitos comportamentais do zinco.

4 CONCLUSÃO

Apesar de outros mecanismos ou vias poderem estar implicados na ação terapêutica do zinco, o aumento da HO-1, principalmente no córtex pré-frontal, e o envolvimento da sinalização do BDNF podem contribuir para desencadear a resposta comportamental de zinco no TSC. Assim, os resultados deste estudo fornecem evidências novas sobre os mecanismos subjacentes às respostas comportamentais antidepressivas do zinco, além de reforçar o papel de HO-1 e da sinalização do BDNF na depressão.

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ZINCO NO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL

Como já mencionado anteriormente nessa tese, o estresse crônico ou intenso pode desencadear mudanças moleculares e celulares, bem como modificações morfológicas e estruturais em neurônios ou em regiões envolvidas na depressão (DURIC e DUMAN, 2013). Vale destacar que o estresse crônico e/ou intenso pode causar anormalidades no eixo HPA e desenvolver um papel relevante nos sintomas depressivos e na recorrência da depressão (HAMMEN, 2005). Dentre as alterações neuroquímicas ocasionadas pelo estresse, destaca-se o aumento nos níveis extracelulares de glutamato (CHARNEY e MANJI, 2004) e alterações na neurotransmissão glutamatérgica em várias regiões encefálicas, incluindo o córtex pré-frontal e o hipocampo (POPOLI *et al.*, 2012). É importante mencionar que o hipocampo expressa receptores de mineralocorticoides e de glicocorticoides, além de ter altas concentrações de glutamato. A ativação dos receptores de glicocorticoides causa aumento da corrente de cálcio levando a um aumento na ativação de receptores NMDA. A superativação desses receptores induz neurotoxicidade e neurodegeneração (CHARNEY e MANJI, 2004), fenômenos fortemente associados com a depressão.

Entre os vários componentes envolvidos na regulação da neurotransmissão glutamatérgica, os transportadores de glutamato, também referidos como EAATs, desempenham um papel chave na modulação do sistema glutamatérgico devido sua capacidade de diminuir o glutamato do espaço extracelular (JIANG e AMARA, 2011). Vale destacar que a expressão de transportadores glutamatérgicos pode ser influenciada por várias condições fisiológicas ou patológicas. Os glicocorticoides, por exemplo, podem aumentar a expressão de GLT-1 (EAAT2 em humanos) no hipocampo de ratos (AUTRY *et al.*, 2006) e a ativação da Akt é capaz de induzir a expressão de GLT-1 em cultura de astrócitos (LI *et al.*, 2006) e EAAC1 (EAAT3 em humanos) em células de glioma (KRIZMAN-GENDA *et al.*, 2005), afetando indiretamente a neurotransmissão glutamatérgica. O GFAP também pode ser alterado em condições de estresse e depressão, além de poder modular a atividade da captação de glutamato através dos efeitos sobre o tráfico e expressão de superfície dos transportadores (HUGHES *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2011; POPOLI *et al.*, 2012).

Como recentemente revisado (SWARDFAGER *et al.*, 2013), vários processos fisiológicos que estão desregulados na depressão podem ser modulados pelo zinco, incluindo a inflamação, a resposta neuroendócrina ao estresse, o estresse oxidativo, a neuroproteção e a neurotransmissão monoaminérgica e glutamatérgica. Além disso, tem sido sugerido que o zinco está envolvido no estoque, liberação ou recaptação de glutamato e na modulação dos receptores glutamatérgicos (FREDERICKSON *et al.*, 2000b; FREDERICKSON, KOH e BUSH, 2005; PAOLETTI *et al.*, 2009).

Considerando essa fundamentação teórica, o objetivo do presente capítulo foi explorar o efeito do zinco em relação ao comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse, alterações na toxicidade induzida pelo glutamato e na expressão de proteínas envolvidas no controle da neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo de camundongos.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 ANIMAIS

Camundongos *Swiss* fêmeas (55-60 dias, pesando 30-45 g) foram mantidas em condição padrão de biotério (20-22°C), com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas (luz acesa as 7:00h). Os animais foram alocados em grupos de 15 em um caixa com 41×34×16 cm. Os testes comportamentais foram conduzidos entre 9:00h e 16:00h. Os animais foram aclimatizados na sala de experimentação pelo menos 12 horas antes dos testes comportamentais. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° PP00795 – **Anexo A**). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e para reduzir o número de animais utilizados nos experimentos.

1.2 COMPOSTOS E TRATAMENTOS

ZnCl₂ e fluoxetina (obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A) foram dissolvidos em água destilada e administrada oralmente (p.o.) em dose de 10 mg/kg uma vez ao dia durante os últimos 7 dias do procedimento de estresse crônico imprevisível. A dose de ZnCl₂ utilizada foi escolhida baseada em experimentos prévios do laboratório (CUNHA *et al.*, 2008). ZnCl₂ e fluoxetina foram preparadas logo antes da administração, que foi realizada em um volume de 10 ml/kg. Para desenvolver o estudo, os camundongos foram divididos em 6 grupos: (1) não estressado + veículo; (2) não estressado + ZnCl₂; (3) não estressado

+ fluoxetina; (4) estressado + veículo; (5) estressado + ZnCl₂; (6) estressado + fluoxetina.

1.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo de estresse crônico imprevisível, adaptado do procedimento descrito por Lu *et al.* (2006), consiste de uma variedade de estressores aplicados aleatoriamente ao longo dos dias por 14 dias (**Tabela III.1**). Este protocolo foi concebido de modo a minimizar a predição. Os animais foram divididos em dois grupos: camundongos controle (não estressados) e camundongos estressados (que foram submetidos pelo protocolo de estresse crônico imprevisível). Animais controle e estressados foram mantidos em gabinetes climatizados separados devido ao odor ocasionado pelo estresse. Durante os 14 dias de protocolo, os animais controle foram mantidos em suas caixas de acordo com as condições previamente reportadas. No 15º dia, 24 horas após a última administração dos tratamentos (ZnCl₂, fluoxetina ou veículo) e da exposição ao último estressor, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. No 16º dia, os animais foram eutanasiados por decapitação e os hipocampos foram coletados para análises bioquímicas (Western blotting ou toxicidade induzida por glutamato).

Para o procedimento de estresse crônico imprevisível, os camundongos foram expostos a vários estímulos estressores imprevisíveis, como mostrado na **Tabela III.1**. O nado forçado ou banho frio foram realizados por colocação do animal em um recipiente cilíndrico aberto (diâmetro 10 cm, altura 25 cm) contendo 19 cm de água a 25 ± 1 °C (para o nado forçado) ou 15 ± 1 °C (para o banho frio). O choque nas patas foi aplicado em um aparelho constituído por uma caixa de plástico de 50 x 25 x 25 cm, com uma parede de vidro dianteira, cujo piso tinha barras paralelas de bronze de 10 mm. Os camundongos foram colocados cuidadosamente sobre as barras e receberam choques nas patas (0,7 mA, 0,5 seg/min por 3 min). Os protocolos de confinamento por imobilização ou imobilização no frio foram aplicados por um período de 90 min (20-22°C) ou 7 min (8°C), respectivamente, utilizando um aparato de contenção individual de roedores feito de acrílico fenestrado. A maravalha molhada e caixa inclinada consistiram em deixar a maravalha úmida, associada com a inclinação da caixa a 45° por 24h. O prendedor pela cauda foi realizado colocando um prendedor localizado a 1 cm a partir da base da cauda (foi usado algodão para evitar lesão na cauda), como previamente descrito

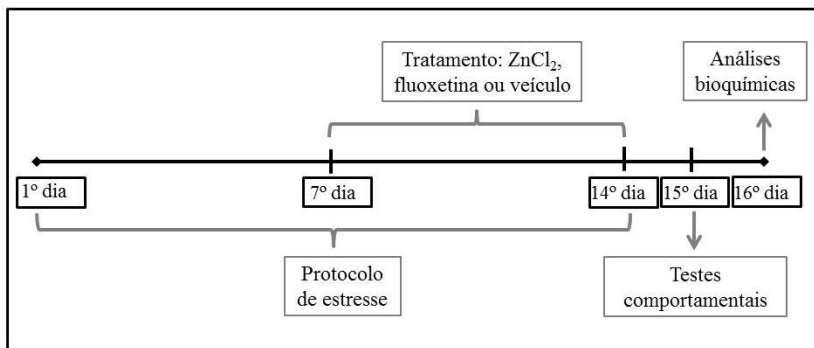
por (LU *et al.*, 2006). O número de animais utilizados para esse protocolo e para os testes comportamentais foram de 8 por grupo.

Tabela III.1. Protocolo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo do estresse crônico imprevisível

Dia	Estressor	Duração	Hora
1	Confinamento	90 min	14:00h
2	Banho frio (15°C)	10 min	09:30h
3	Maravalha molhada / caixa inclinada 45°	24 h	10:30h
4	Confinamento no frio (8°C)	7 min	17:30h
5	Prendedor na cauda	10 min	13:00h
6	Nado forçado	6 min	14:00h
7	Confinamento	90 min	09:30h
8	Choque inescapável (0,7 mA, 0,5 seg/min)	3 min	08:30h
9	Banho frio (15°C)	10 min	14:30h
10	Maravalha molhada / caixa inclinada 45°	24 h	13:00h
11	Choque inescapável (0,7 mA, 0,5 seg/min)	3 min	18:30h
12	Confinamento no frio (8°C)	7 min	10:00h
13	Prendedor na cauda	10 min	14:30h
14	Choque inescapável (0,7 mA, 0,5 seg/min)	3 min	15:00h

1.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

O diagrama do protocolo experimental é demonstrado na **Figura III.1.**

Figura III.1. Diagrama do protocolo experimental

Legenda: Camundongos *Swiss* fêmeas foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível por 14 dias. Do 7º ao 14º dias os animais também receberam ZnCl₂ (10 mg/kg), fluoxetina (10 mg/kg) ou veículo (grupo controle). No 15º dia, 24 horas após a última administração dos tratamentos (ZnCl₂, fluoxetina ou veículo) e após o último estressor, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. No 16º dia, os hipocampos foram coletados para análises bioquímicas. Abreviatura: ZnCl₂, cloreto de zinco.

1.4.1 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

O TSC foi realizado conforme descrito anteriormente (item 1.3.1 do capítulo 1).

1.4.2 Teste do campo aberto (TCA)

O TCA foi realizado conforme descrito anteriormente (item 1.3.2 do capítulo 1).

1.5 TOXICIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO

No 16º dia do protocolo, camundongos (5-6 por grupo) foram eutanaziados por decapitação e os hipocampos foram rapidamente removidos e mantidos em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) composto por NaCl 122mM; KCl 3mM; MgSO₄ 1,2mM; CaCl₂ 1.3 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM; NaHCO₃ 25 mM; D-glicose 10 mM gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir o pH de 7,4. As fatias de 0,4 mm de espessura foram obtidas usando um fatiador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper) e pré-incubadas por 30 min a 37°C em poços de cultura de acordo como descrito previamente (MOLZ *et al.*, 2008). Em seguida, as fatias foram expostas por 1 h ao L-

glutamato (Sigma) (10 mM) diluído no meio de incubação descrito acima. Após esse período, o meio foi retirado e substituído por um meio de cultura nutritivo composto de 50% KRB, 50% DMEM (Gibco, Grand Island, NY), HEPES 20 mM, e gentamicina 100 µg/ml. As fatias foram mantidas por 4 h em uma atmosfera modificada a 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C para avaliar a viabilidade celular (MOLZ *et al.*, 2008; MOLZ *et al.*, 2011).

A viabilidade celular foi determinada através da capacidade das células em reduzirem o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-difeniltetrazolium brometo (MTT; Sigma) (MOSMANN, 1983). As fatias hipocâmpais foram incubadas com MTT (0,5 mg/ml) em KRB por 20 min a 37°C. O anel tetrazólio do MTT pode ser clivado através de redução por desidrogenases mitocondriais, produzindo um precipitado formazan. O formazan produzido foi solubilizado pela adição de DMSO, resultando em um composto com cor de cor púrpura cuja densidade óptica foi mensurada com um leitor de ELISA (540 nm).

1.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

1.6.1 Preparação do tecido

No 16º dia do protocolo, camundongos (4-5 por grupo) foram eutanasiados por decapitação e os hipocâmpos foram rapidamente dissecados (4°C) e armazenados a uma temperatura de -80°C até o uso. As amostras foram preparadas e a dosagem de proteína foi feita como descrita anteriormente (item 1.4.1 do capítulo 1).

1.6.2 Western blotting

A mesma quantidade de proteína (60 µg por poço) para cada amostra foi eletrotransferida em minigéis de SDS-PAGE (10% de acrilamida) e transferida para membrana de nitrocelulose usando um sistema de transferência a 40 mV e 216 mA por 1h30 (ECL Semi-dry Blotters, Amersham Biosciences, England). Para verificar a eficiência da transferência, os géis foram corados com Coomassie blue e as membranas com Ponceau S.

Após essa etapa, as membranas resultantes foram incubadas em uma solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em TBS) por 1 hora a temperatura ambiente. Subsequentemente, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-GLT-1 (Santa Cruz, 1:1000), anti-EAAC1 (Millipore, 1:1000), anti-GFAP (Sigma, 1:1000) and anti-phospho-Akt (Ser473) and anti-Akt (Cell Signaling, 1:1000). Todos os anticorpos foram diluídos em uma solução de TBS que continha 0.1% Tween 20 (TBS-T). A seguir, todas as membranas foram incubadas com

anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Millipore 1:2500), exceto as membranas para EAAC1, que foram incubadas com anticorpo secundário anti-cabra conjugado com peroxidase (Santa Cruz 1:2000) por 1 hora. A imunoreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente LumiGLO® (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA), segundo especificações do fabricante. Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina (Santa Cruz, 1:250) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel e avaliadas com um anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Cell Signaling 1:5000).

A DO das bandas foi quantificada usando Image Lab software® (Bio-Rad Laboratories). O nível de fosforilação da Akt foi determinado pela razão entre a DO da Akt fosforilada / DO da Akt total. Os imunoconteúdos de GLT-1, EAAC1, GFAP, Akt total e Akt fosforilada foram determinados pelas relações entre as DO dessas proteínas / DO da β -actina respectiva. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

1.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar o pressuposto de normalidade de dados comportamentais e bioquímicos. Todas as variáveis do presente estudo mostraram uma distribuição normal. Dessa forma, as diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas através ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Duncan (para as análises comportamentais e imunoblottings) quando apropriado ou ANOVA de três vias (para a toxicidade induzida por glutamato). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados estão expressos em média + E.P.M..

2 RESULTADOS

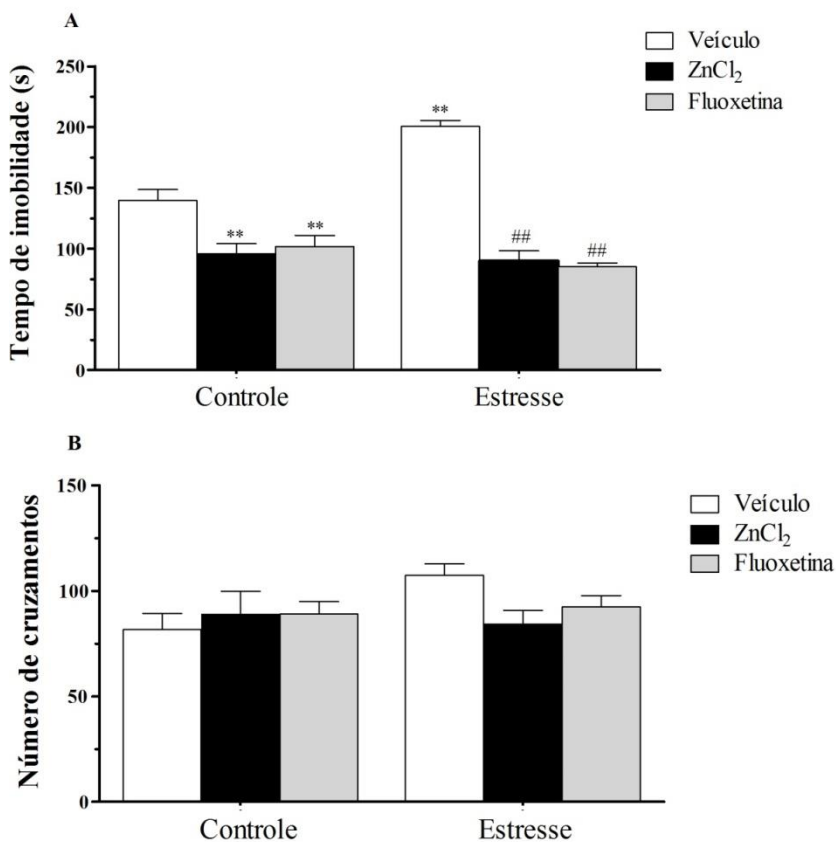
2.1 OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

A **Figura III.2A** mostra a influência do tratamento de camundongos com $ZnCl_2$ e fluoxetina no comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo de estresse crônico imprevisível. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o protocolo de estresse [F(1,42)=4,15, $p < 0,05$], tratamento [F(2,42)=69,55, $p < 0,01$] e interação entre estresse x tratamento [F(2,42)=15,49, $p < 0,01$]. Análise

de *post hoc* indicou que a exposição a diferentes estressores por 14 dias aumentou significativamente o tempo de imobilidade no TSC, quando comparado com o grupo controle ($p < 0,01$). A administração de $ZnCl_2$ por 7 dias impediu o aumento no tempo de imobilidade em camundongos estressados ($p < 0,01$), um efeito comparável ao exercido pela fluoxetina ($p < 0,01$). $ZnCl_2$ e fluoxetina administrados em camundongos não estressados também foram capazes de diminuir o tempo de imobilidade no TSC, em comparação com os animais controle ($p < 0,01$).

A fim de se excluir a possibilidade de que as alterações no tempo de imobilidade no TSC fossem devido a qualquer interferência na atividade locomotora dos animais, foi mensurado o número de cruzamentos (**Figura III.2B**). Nenhum dos tratamentos alterou a atividade locomotora no TCA (protocolo de estresse [$F(1,42)=1,87$, $p=0,18$], tratamento [$F(2,42)=0,60$, $p=0,55$] e interação entre protocolo de estresse x tratamento [$F(2,42)=2,36$, $p=0,11$]).

Figura III.2. Efeito do tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina no protocolo de estresse crônico imprevisível

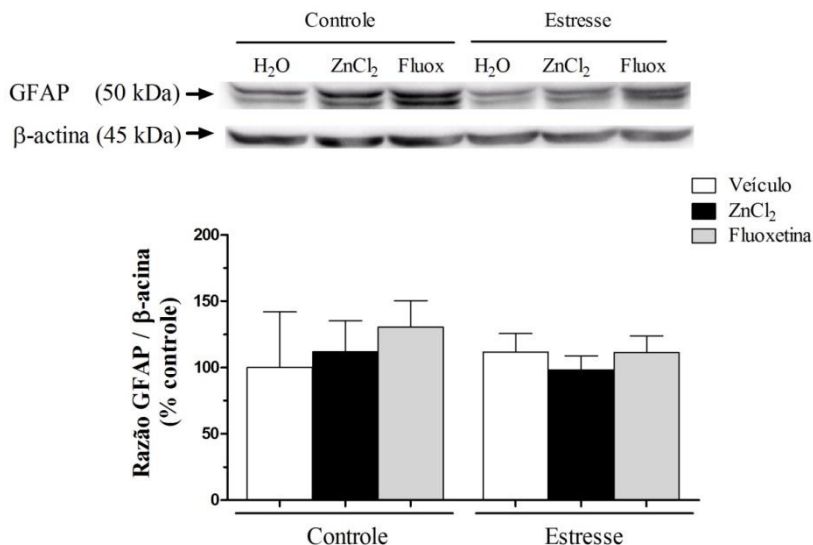


Legenda: Efeito do tratamento repetido com $ZnCl_2$ ou fluoxetina no tempo de imobilidade no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B) em camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível. As barras representam médias + E.P.M. ($n = 8$). ** $p < 0,01$ comparado com grupo controle, ## $p < 0,01$ comparado com grupo estresse + veículo. (ANOVA de duas vias seguida de *post hoc* de Duncan). Abreviatura: $ZnCl_2$, cloreto de zinco.

2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A **Figura III.3** mostra um Western blotting representativo do imunoconteúdo hipocampal do GFAP obtido de camundongos estressados ou não estressados. A análise densitométrica não revelou mudanças no imunoconteúdo da GFAP (protocolo de estresse [F(1,24)=0,32, p=0,58], tratamento [F(2,24)=0,69, p=0,51] e interação entre protocolo de estresse x tratamento [F(2,24)=0,58, p=0,57]).

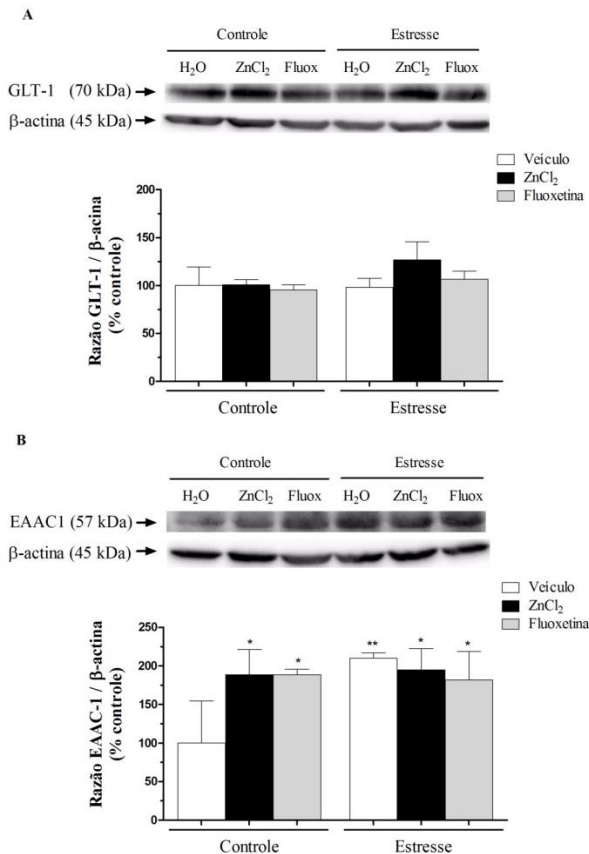
Figura III.3. Efeito repetido do tratamento com ZnCl₂ ou fluoxetina no imunoconteúdo de GFAP no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível



Legenda: Efeito repetido do tratamento com ZnCl₂ ou fluoxetina no imunoconteúdo de GFAP no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível. Uma imagem representativa e a análise quantitativa normalizada pelo conteúdo da β-actina é mostrada. Os resultados são expressos como percentual do controle (média + E.P.M. de 5 camundongos; ANOVA de duas vias). Abreviaturas: GFAP, proteína glial fibrilar ácida; ZnCl₂, cloreto de zinco.

GLT-1, o principal transportador de glutamato glial foi avaliado por Western blotting e um resultado representativo do imunocnteúdo hipocampal do GLT-1 de camundongos estressados ou não estressados é demonstrado na **Figura III.4A**. A análise densitométrica também não revelou mudanças no imunocnteúdo hipocampal de GLT-1 (protocolo de estresse [F(1,24)=2,16, p=0,15], tratamento [F(2,24)=1,33, p=0,28] e interação entre protocolo de estresse x tratamento [F(2,24)=1,02, p=0,38]). Por outro lado, ANOVA de duas vias revelou diferença significativa para o imunocnteúdo de EAAC1 (**Figura III.4B**) (protocolo de estresse [F(1,18)=3,64, p=0,07], tratamento [F(2,18)=1,41, p=0,27] e interação entre protocolo de estresse x tratamento [F(2,18)=3,72, p<0,05]). Análise de *post hoc* indicou que em animais não estressados, o tratamento com ZnCl₂ ou fluoxetina aumentou o imunocnteúdo de EAAC1 quando comparado com animais tratados com veículo (p<0,05). O protocolo de estresse crônico imprevisível também foi capaz de aumentar o imunocnteúdo de EAAC1 (p<0,01). Similarmente, 7 dias de administração de ZnCl₂ aumentou significativamente o imunocnteúdo de EAAC1 em camundongos estressados (p<0,05), um efeito comparável com o exercido pela fluoxetina (p<0,01).

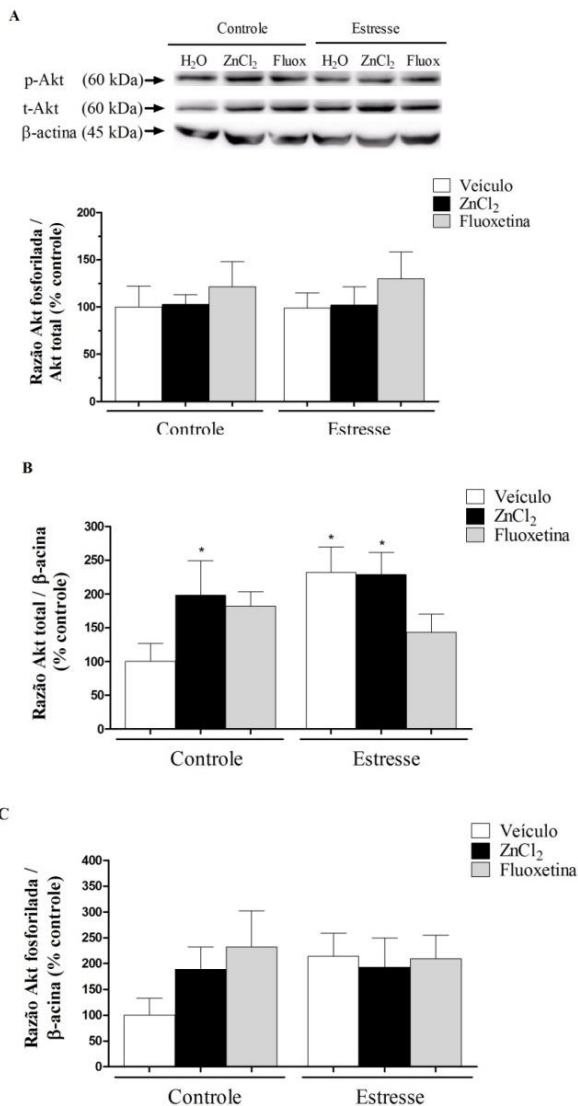
Figura III.4. Efeito repetido do tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina no imunocontéudo de GLT-1 e EAAC-1 no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível



Legenda: Efeito repetido do tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina no imunocontéudo de GLT-1 (painel A) e EAAC-1 (painel B) no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível. Uma imagem representativa e a análise quantitativa normalizada pelo conteúdo da β -actina é mostrada. Os resultados são expressos como percentual do controle (média + E.P.M. de 4-5 camundongos; ANOVA de duas vias). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (não estressado + veículo), ** $p < 0,01$ comparado com o grupo controle (não estressado + veículo). Abreviaturas: $ZnCl_2$, cloreto de zinco.

Nenhuma alteração na razão p-Akt/t-Akt (**Figura III.5A**) foi observada em qualquer grupo experimental (protocolo de estresse [F(1,21)=0,02, p=0,89], tratamento [F(2,21)=1,13, p=0,32] e interação entre protocolo de estresse x tratamento [F(2,21)=0,04, p=0,96]). Entretanto, em relação à Akt, a ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa para interação entre protocolo de estresse x tratamento [F(2,23)=4,05, p<0,05]), mas não mostrou um efeito significativo do protocolo de estresse [F(1,23)=2,70, p=0,11] e do tratamento [F(2,23)=1,66, p=0,21] (**Figura III.5B**). Análise de *post hoc* indicou que em camundongos estressados, o imunoconteúdo da Akt estava aumentado (p<0,05). O tratamento com ZnCl₂ (em camundongos não estressados ou estressados) também aumentou o imunoconteúdo da Akt (p<0,05). Por outro lado, o tratamento com fluoxetina não alterou o imunoconteúdo da Akt (nem em animais não estressados e nem em animais estressados). Nenhuma alteração no imunoconteúdo da p-Akt (**Figura III.5C**) foi observada em qualquer grupo experimental (protocolo de estresse [F(1,24)=0,63, p=0,43], tratamento [F(2,24)=0,86, p=0,43] e interação entre protocolo de estresse x tratamento [F(2,24)=1,11, p=0,34]).

Figura III.5. Efeito repetido do tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina na relação p-Akt/t-Akt e no imunoc conteúdo da t-Akt e p-Akt no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível



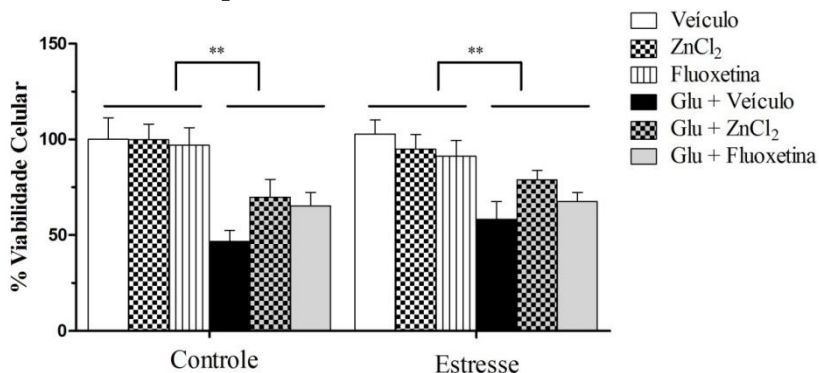
Legenda: Efeito repetido do tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina na relação p-Akt/t-Akt (painel A) e no imunoc conteúdo da t-Akt (painel B) e

p-Akt (painel C) no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível. Uma imagem representativa e a análise quantizada normalizada pelo conteúdo da t-Akt é mostrada. O nível de fosforilação da Akt foi determinado pela relação da DO da banda fosforilada sobre a DO da banda total. Os imunocorrelatos da t-Akt e p-Akt foram normalizados pelo conteúdo da β -actina. Os resultados são expressos como percentual do controle (média + E.P.M. de 4-5 camundongos; ANOVA de duas vias). * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (não estressado + veículo). Abreviaturas: Akt, proteína cinase B; $ZnCl_2$, cloreto de zinco.

2.3 TOXICIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO

As fatias hipocâmpais obtidas dos animais controle ou submetidas ao protocolo de estresse crônico imprevisível e que foram incubadas *ex vivo* com 10 mM de glutamato tiveram uma redução na viabilidade celular comparada com fatias hipocâmpais incubadas com o tampão (KRB). O tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina não protegeu contra a toxicidade induzida pelo glutamato (**Figura III.6**). A ANOVA de três vias revelou que as fatias hipocâmpais que não foram incubadas com glutamato tinham uma viabilidade celular similar em todos os grupos (nem o protocolo de estresse e nem o tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina influenciou na viabilidade celular) (protocolo de estresse [F(1,51)=0,30, $p=0,59$], tratamento [F(2,51)=1,31, $p=0,28$]). A exposição das fatias hipocâmpais a 10 mM de glutamato resultou em uma diminuição na viabilidade celular, mensurada pela redução do MTT (incubação com glutamato [F(1,51)=52,72, $p < 0,01$]). O protocolo de estresse crônico imprevisível não foi efetivo em prevenir ou intensificar a diminuição na viabilidade celular. Apesar do tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina não terem prevenido a morte celular induzida por glutamato, existiu uma tendência desses tratamentos em prevenir a redução na viabilidade celular induzida pelo glutamato (interação entre incubação de glutamato x tratamento [F(2,51)=3,062, $p=0,056$]). As demais interações não deram diferença significativa na ANOVA de três vias (interação entre incubação com glutamato x protocolo de estresse [F(1,51)=1,27, $p=0,27$], interação entre tratamento x protocolo de estresse [F(2,51)=0,32, $p=0,73$] e interação entre incubação com glutamato x tratamento x protocolo de estresse [F(2,51)=0,04, $p=0,96$]).

Figura III.6. Avaliação da viabilidade celular em fatias hipocâmpais expostas ao glutamato de camundongos previamente tratados com ZnCl₂ ou fluoxetina e submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível



Legenda: Fatias hipocâmpais não tratadas (controle) ou tratadas com 10 mM de Glu foram incubadas por 1 h em meio de cultura. Após esse período, o meio foi substituído por um meio de cultura sem glutamato e as fatias foram mantidas por mais 4 h. O grupo controle (não estressado e não tratado) foi considerado como 100% e representa a viabilidade celular de fatias incubadas apenas com meio de cultura. MTT (0,5 mg/ml) foi incubado por 20 minutos a 37°C e a viabilidade celular foi mensurada a 540 nm. ** $p < 0,01$ fatias hipocâmpais incubadas com glutamato comparada com fatias não submetidas ao glutamato. Os valores são expressos em média + E.P.M. ($n = 5-6$ realizado em triplicata). (ANOVA de três vias). Abreviações: Glu, glutamato; ZnCl₂, cloreto de zinco.

3 DISCUSSÃO

Os principais resultados desse capítulo podem ser sumarizados a seguir: [a] o protocolo de estresse crônico imprevisível aumentou o tempo de imobilidade no TSC, um resultado indicativo de comportamento tipo-depressivo; [b] a prevenção desse comportamento tipo-depressivo foi evidenciada em camundongos estressados tratados com zinco ou fluoxetina; [c] nenhuma alteração no imunocontéudo de GLT-1, GFAP e Akt fosforilada ou na fosforilação da Akt (relação Akt fosforilada/Akt total) foi observada em qualquer grupo experimental; [d] o imunocontéudo do EACC1 foi aumentado em camundongos estressados tratados com zinco, fluoxetina ou veículo e em animais não

estressados tratados com zinco e fluoxetina; [e] o imunoconteúdo da Akt foi aumentado em camundongos estressados e em animais tratados com zinco (estressados ou não estressados); [f] a exposição de fatias hipocâmpais ao glutamato significativamente diminuiu a viabilidade celular, mas nem o protocolo de estresse crônico imprevisível e nem o tratamento com zinco ou fluoxetina alteraram esse resultado.

Modelos de depressão são utilizados, principalmente, a fim de avaliar a eficácia de candidatos antidepressivos, bem como para investigar os aspectos fisiopatológicos relacionados a este transtorno de humor. O modelo do estresse crônico imprevisível foi desenvolvido numa tentativa de reproduzir um dos principais fatores ambientais relacionados com o desenvolvimento da depressão em seres humanos (WILLNER, 1997). Estudos utilizando esse modelo animal tem demonstrado que o estresse crônico imprevisível é capaz de aumentar o tempo de imobilidade em testes de desespero comportamental, por exemplo, no TSC e TNF, demonstrando que esse modelo ocasiona um comportamento tipo-depressivo, que é prevenido com o uso de antidepressivos (LU *et al.*, 2006; LARSEN *et al.*, 2010; KUMAR, KUHAD e CHOPRA, 2011; MORETTI *et al.*, 2012). Além disso, este modelo de estresse provoca uma diminuição do consumo de solução doce palatável, diminuição de autocuidado e do comportamento motivacional, sintomas comparáveis à anedonia, que é um dos sintomas necessários para o diagnóstico da depressão em seres humanos (WILLNER *et al.*, 1987; LU *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2009; ISINGRINI *et al.*, 2010). Além disso, o modelo de estresse crônico imprevisível tem características fisiopatológicas da depressão em humanos, como por exemplo, o evento causal (estresse), a diminuição dos níveis de BDNF e do fator de crescimento do nervo no hipocampo e no córtex pré-frontal (LIU *et al.*, 2014; FILHO *et al.*, 2015), o aumento nos níveis séricos de corticosterona e dos níveis de citocinas inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2015). Levando em consideração o exposto, está bem estabelecido que este modelo animal tem uma boa validade preditiva (mudanças comportamentais são revertidas pelo tratamento crônico com antidepressivos), validade de face (similaridade dos sintomas) e validade de constructo (semelhança nas características fisiopatológicas/etiologia) (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; WILLNER, 1997; 2005). Sendo assim, os dados do presente capítulo estão de acordo com dados prévios que demonstram um comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível em roedores.

O presente capítulo também demonstrou que o tratamento nos últimos 7 dias com zinco ou fluoxetina foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo de estresse crônico imprevisível (14 dias). Além disso, é importante mencionar que nem o zinco e nem a fluoxetina afetaram a locomoção espontânea dos animais, excluindo a hipótese de que efeitos psicoestimulantes possam ser os responsáveis pelos efeitos comportamentais no TSC. De forma similar, estudos pré-clínicos tem demonstrado que o zinco tem um efeito tipo-antidepressivo em testes preditivos para depressão (KROCZKA *et al.*, 2000; KROCZKA *et al.*, 2001; ROSA *et al.*, 2003; CUNHA *et al.*, 2008; LOBATO *et al.*, 2008; SZEWCZYK *et al.*, 2009). Reforçando a noção de que o zinco desempenha um papel significativo na fisiopatologia da depressão, estudos pré-clínicos demonstraram que camundongos *knockout* para GPR39 (receptor do zinco) exibem um comportamento de tipo-depressivo (MLYNIEC *et al.*, 2015a). Além disso, a falta do gene do GPR39 prejudicou a resposta dos antidepressivos que atuam no sistema monoaminérgico (MLYNIEC, GAWEL e NOWAK, 2015). É interessante observar que ratos deficientes em zinco apresentaram uma diminuição na expressão de GPR39 no hipocampo e no córtex frontal (MLYNIEC *et al.*, 2014). Digno de nota, outros estudos pré-clínicos já demonstraram que o zinco exerceu efeitos antidepressivos em modelos de depressão, como o modelo da bulbectomia olfatória (NOWAK *et al.*, 2003b) e o estresse crônico imprevisível (CIESLIK *et al.*, 2007), ambos realizados em ratos. É importante mencionar que o tratamento crônico com zinco também preveniu alterações induzidas pelo estresse crônico imprevisível, como a redução nos níveis de BDNF em ratos (CIESLIK *et al.*, 2011). Assim, os resultados do presente trabalho reforçam o efeito tipo-antidepressivo do zinco, demonstrando que esse mineral também é efetivo em reverter a alteração comportamental induzida pelo estresse crônico imprevisível em camundongos. Vale destacar que, outros nutrientes que também estão emergindo como compostos para auxiliar no tratamento da depressão, nomeadamente ácido ascórbico (MORETTI *et al.*, 2012), magnésio (POCHWAT *et al.*, 2014) e cromo (DUBEY *et al.*, 2015), exibem um perfil comportamental similar quando são avaliados em protocolos de estresse.

A GFAP é uma proteína de filamento intermediário que tem sido considerada como um marcador de astrócitos e pode ser induzida por degeneração, dano ou envelhecimento (SANACORA e BANASR, 2013). Em ratos submetidos à protocolos de estresse crônico (2 estressores por dia por 35 dias) foi reportado uma diminuição na

expressão do RNAm para GFAP no córtex pré-frontal associado a um comportamento tipo-depressivo (BANASR e DUMAN, 2008; BANASR *et al.*, 2010), enquanto que o tratamento com riluzol protegeu contra as alterações comportamentais e a redução na expressão da GFAP induzida pelo estresse crônico imprevisível (BANASR *et al.*, 2010). Similar a esses resultados, o estresse de contenção crônico (6h/dia por 3 semanas) diminuiu os níveis da proteína GFAP na matéria cinzenta periaquedutal de ratos (IMBE *et al.*, 2012). Em dois outros estudos, os níveis de RNAm e da proteína GFAP foram diminuídos no hipocampo de ratos submetidos ao estresse crônico imprevisível (por 5 semanas) (LIU *et al.*, 2009; 2011). Por outro lado, em ratos submetidos ao estresse de separação neonatal, uma redução no número de células marcadas para GFAP foi observada no córtex pré-central medial, mas não no hipocampo (MUSHOLT *et al.*, 2009). No presente estudo, não foi observado nenhuma mudança no imunoconteúdo da GFAP no hipocampo de camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível ou aos tratamentos. É possível que o período do protocolo (número de dias) não tenha sido suficiente para induzir mudanças nessa proteína, apesar de não se descartar a possibilidade de que mudanças nesse parâmetro terem ocorrido em outras regiões encefálicas.

O envolvimento do sistema glutamatérgico na fisiopatologia da depressão é bem reconhecido (MATHEWS, HENTER e ZARATE, 2012), embora ainda há muito a ser descoberto. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos, mas um conteúdo excessivo desse neurotransmissor na fenda sináptica pode provocar efeitos excitotóxicos (NICIU, KELMENDI e SANACORA, 2012). É interessante ressaltar que o antagonista do receptor NMDA cetamina produz ação antidepressiva rápida e duradoura em pacientes resistentes ao tratamento (BERMAN *et al.*, 2000; ZARATE *et al.*, 2006), além de um efeito tipo-antidepressivo em roedores (GARCIA *et al.*, 2008; REUS *et al.*, 2011). Adicionalmente, uma diminuição na expressão e no conteúdo dos EAATs e da glutamina sintetase tem sido reportada no encéfalo pós-morte de pacientes depressivos (CHOUDARY *et al.*, 2005; MIGUEL-HIDALGO *et al.*, 2010; BERNARD *et al.*, 2011), sugerindo que o metabolismo e o *clearance* do glutamato provavelmente estão prejudicados no encéfalo de pacientes depressivos. Deve-se também mencionar que o protocolo de estresse crônico imprevisível aumenta o conteúdo vesicular de glutamato no hipocampo dorsal (RAUDENSKY e YAMAMOTO, 2007). Por outro lado, o tratamento agudo com antagonistas de receptor NMDA melhora

comportamentos tipo-anedônico e tipo-ansio gênico induzidos pelo estresse crônico imprevisível (LI *et al.*, 2011).

Dessa forma, o presente estudo investigou a influência do estresse crônico imprevisível, do zinco ou da fluoxetina no imunoconteúdo de transportadores de glutamato, que são respostáveis por auxiliar na manutenção dos níveis fisiológicos de glutamato no encéfalo, bem como em um modelo *ex vivo* de toxicidade induzida por glutamato.

GLT-1 (ou EAAT2) é amplamente expresso em astrócitos em todas as regiões encefálicas, principalmente no hipocampo e no neocórtex (LEVY *et al.*, 1993; ZHOU e DANBOLT, 2013). A *down-regulation* do GLT-1 tem sido reportada em várias doenças neurológicas tais como, psicose, epilepsia, acidente vascular encefálico e doenças neurodegenerativas (SONI, REDDY e KUMAR, 2014). Dados da literatura demonstraram que ratos submetidos ao estresse exibem aumento na expressão da proteína GLT-1 na região CA3 e no giro denteado do hipocampo (AUTRY *et al.*, 2006). Em outro estudo, estresse de imobilização crônico (6h de imobilização por dia, por 21 dias) aumentou a expressão do RNAm de GLT-1 no giro denteado e na região CA3, um efeito que foi inibido pelo antidepressivo tianeptina (REAGAN *et al.*, 2004). Por outro lado, ratos tratados por 14 dias com fluoxetina tiveram diminuição na expressão de GLT-1 no córtex e no hipocampo, apesar de outros antidepressivos (desipramina e tranilcipromina) não terem alterado a expressão de GLT-1 (ZINK *et al.*, 2011). A exposição de ratos a dez dias de estresse crônico imprevisível (2 estressores por dia) também provocou um aumento na imunoreatividade de GLT-1 no hipocampo dorsal (RAUDENSKY e YAMAMOTO, 2007). Por outro lado, a prole de ratos estressados no período pré-natal demonstrou uma redução nos níveis de RNAm de GLT-1 no hipocampo, estriado e córtex frontal (ZHANG *et al.*, 2013b). Em ratos submetidos ao protocolo de desamparo aprendido, outro modelo de depressão, uma diminuição na expressão de GLT-1 no hipocampo e córtex cerebral também foi reportada (ZINK *et al.*, 2010). De forma similar, a administração oral de corticosterona (por 14 dias) diminuiu os níveis de GLT-1 em camundongos, um efeito abolido pelo tratamento com antidepressivo (riluzol por 3 semanas) (GOURLEY *et al.*, 2012). Estresse de imobilização crônica (6h por dia por 3 semanas) também causou uma diminuição no conteúdo de GLT-1 na matéria cinzenta periaquedutal de ratos (IMBE *et al.*, 2012). Outro estudo demonstrou que ratos expostos a protocolo de estresse crônico imprevisível (2 sessões por dia por 35 dias) tiveram uma diminuição na expressão hipocampal de GLT-1 e que o tratamento com fluoxetina (por

4 semanas) reverteu essa alteração (CHEN *et al.*, 2014). Apesar dos dados da literatura serem controversos, o presente estudo não encontrou mudanças no imunoconteúdo de GLT-1 em nenhum grupo experimental. Isto pode ter ocorrido devido a diferenças nos protocolos de estresse, e/ou da espécie de animal utilizado. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de alterações terem ocorrido em uma região específica do hipocampo ou em outra região encefálica não avaliada no presente estudo.

EAAC1 (ou EAAT3) é um transportador do glutamato que é principalmente expresso em neurônios encefálicos (HOLMSETH *et al.*, 2012). Além de auxiliar no controle da neurotransmissão glutamatérgica, o EAAC1 pode transportar aminoácidos dicarboxílicos e cisteína. Isso sugere que esse transportador também pode contribuir para a síntese da glutathiona e subsequente proteção contra o estresse oxidativo (CHEN e SWANSON, 2003; BIANCHI *et al.*, 2014). Digno de nota, já foi demonstrado que a glutathiona possui efeito tipo-antidepressivo (ROSA, DAFRE e RODRIGUES, 2013). Além disso, está bem estabelecido que o estresse oxidativo está implicado na fisiopatologia da depressão (MOYLAN *et al.*, 2014; TALAROWSKA *et al.*, 2014). Entretanto, o envolvimento do EAAC1 nos transtornos depressivos ainda não é bem estabelecido. Um dos estudos relacionados com esse tema demonstrou uma redução na expressão do RNAm do EAAC1 em uma prole de ratos estressados no período pré-natal que tem comportamento tipo-depressivo (ZHANG *et al.*, 2013b). Em ratos submetidos ao protocolo de desamparo aprendido, por outro lado, nenhuma mudança foi observada na expressão do EAAC1 (ZINK *et al.*, 2010). Por outro lado, o presente estudo demonstrou que 14 dias de estresse crônico imprevisível aumentou os níveis de EAAC1 no hipocampo de camundongos. O mecanismo envolvido no aumento induzido pelo estresse no imunoconteúdo de EAAC1 não foi diretamente investigado, no entanto, é plausível supor que poderia ser devido a um efeito compensatório ocorrido por uma possível mudança na neurotransmissão glutamatérgica, mas essa hipótese precisa ser melhor investigada. Curiosamente, nosso estudo demonstrou também que o tratamento durante 7 dias com zinco ou fluoxetina aumentou o imunoconteúdo de EAAC1 em camundongos estressados ou não-estressados. Estes resultados sugerem que estes compostos podem auxiliar na modulação da neurotransmissão glutamatérgica, que pode ter sido uma das razões pelas quais o protocolo de estresse crônico imprevisível não alterou a viabilidade das células em fatias hipocâmpais. Vale ressaltar que a captação de cisteína dependente do EAAC1 é

importante para a homeostase de zinco e função antioxidante neuronal sob condições isquêmicas (WON *et al.*, 2010; JANG *et al.*, 2012).

Considerando que a Akt é uma proteína associada com a redistribuição do transportador EAAC1 do componente subcelular para a membrana plasmática (KRIZMAN-GENDA *et al.*, 2005; NIEOULLON *et al.*, 2006), esse estudo investigou se o estresse ou os tratamentos poderiam influenciar no imunocontéudo ou fosforilação da Akt. Como evidenciado, camundongos estressados tratados com veículo e animais tratados com zinco (estressados ou não estressados) tiveram uma aumento no imunocontéudo da Akt, que pode ser, pelo menos em parte, relacionado com o aumento do EAAC1. Isso está de acordo com dados publicados que demonstram que o zinco é capaz de aumentar a Akt em diversos tecidos (BARTHEL *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; RYU *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2012). Em relação ao efeito da fluoxetina sobre este parâmetro, embora tenha ocorrido uma tendência para aumentar o imunocontéudo do EAAC1 nos camundongos tratados com esse antidepressivo, não foi observada alteração significativa no imunocontéudo da Akt, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos no aumento do EAAC1 induzido pela fluoxetina.

Em seguida, realizamos um experimento *ex vivo* expondo as fatias hipocampais dos animais que passaram pelo protocolo de estresse crônico imprevisível. A exposição das fatias hipocampais ao glutamato diminuiu a viabilidade celular e nem o estresse ou os tratamentos foram capazes de influenciar nesse parâmetro, apesar de ter existido uma tendência na prevenção dessas alterações no grupo tratado com zinco. O zinco é bem conhecido como antagonista do receptor NMDA (PETERS, KOH e CHOI, 1987; FREDERICKSON, KOH e BUSH, 2005). Tem sido demonstrado que a inibição do receptor NMDA (ROSA *et al.*, 2003), bem como outras alterações no sistema glutamatérgico (CICHY *et al.*, 2009) são possíveis mecanismos envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do zinco. Em ratos alimentados com dieta deficiente de zinco foram reportadas alterações nos receptores NMDA no hipocampo (aumento da expressão de GluN2A no hipocampo e córtex pré-frontal e de GluN2B no hipocampo) de maneira similar ao observado na depressão (DOBOSZEWSKA *et al.*, 2014). Portanto, embora os estudos sugiram que o comportamento tipo-antidepressivo do zinco envolve, pelo menos em parte, a inibição do receptor NMDA, e que o estresse também pode influenciar na neurotransmissão glutamatérgica, no presente trabalho não foi observado qualquer efeito protetor do zinco em nosso protocolo experimental.

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste terceiro capítulo corroboram o efeito tipo-antidepressivo de zinco, uma vez que esse mineral impediu o comportamento tipo-depressivo induzido pelo modelo de estresse crônico imprevisível. O protocolo de estresse crônico imprevisível, bem como o tratamento com zinco ou fluoxetina aumentaram o imunoconteúdo de EAAC1 no hipocampo dos animais. Nem o estresse e nem os tratamentos protegeram as fatias hipocâmpais da toxicidade induzida por glutamato em um modelo *ex vivo*. Da mesma forma, o imunoconteúdo de GLT-1 e GFAP não foram alterados por estes protocolos. Assim, o presente estudo reforça a noção de que o zinco pode ser um agente promissor para auxiliar no tratamento da depressão, pela modulação da neurotransmissão glutamatérgica. Entretanto, estudos centrados em uma profunda investigação sobre os mecanismos subjacentes envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do zinco são necessários.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o objetivo de melhorar o tratamento da depressão, bem como diminuir os efeitos colaterais e o tempo de resposta dos antidepressivos, a busca por novas estratégias terapêuticas que possam auxiliar no tratamento da depressão está intensificada nos últimos anos. Dentre os compostos que estão sendo estudados, o zinco se destaca por apresentar vários estudos pré-clínicos (KROCZKA *et al.*, 2001; SZEWCZYK *et al.*, 2002; CIESLIK *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2008; SZEWCZYK *et al.*, 2009; JOSHI *et al.*, 2012) e clínicos (MAES *et al.*, 1994; SIWEK *et al.*, 2010; MASEREJIAN, HALL e MCKINLAY, 2012; RANJBAR *et al.*, 2014) sugerindo seu potencial efeito antidepressivo. Entretanto, os mecanismos pelos quais o zinco age ainda não são totalmente esclarecidos. O presente estudo estendeu os conhecimentos acerca dos mecanismos fisiopatológicos implicados no efeito tipo-antidepressivo do zinco, através de estudos agudos envolvendo vias de sinalização intracelular e de um modelo crônico de depressão em camundongos.

Embora a hipótese monoaminérgica ainda seja aceita para explicar a fisiopatologia da depressão, outros mecanismos e hipóteses também estão envolvidos no desenvolvimento e progressão desse transtorno de humor. Entre elas, destaca-se a hipótese neurotrófica. Segundo essa hipótese, a diminuição de fatores neurotróficos no encéfalo, como o BDNF, pode culminar com uma diminuição na neurogênese e aumento da apoptose neuronal, especialmente no hipocampo, o que colaboraria para o desenvolvimento e/ou progressão da depressão (GROVES, 2007; HAASE e BROWN, 2015). Estudos em humanos demonstraram que pacientes depressivos tem uma diminuição hipocampal ou sérica do BDNF (KAREGE *et al.*, 2005a; KAREGE *et al.*, 2005b; SEN, DUMAN e SANACORA, 2008; AUTRY e MONTEGGIA, 2012). Por outro lado, após o tratamento com antidepressivos, é visto um reestabelecimento dos níveis do BDNF (CHEN *et al.*, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2003; DUMAN e MONTEGGIA, 2006; AUTRY e MONTEGGIA, 2012; DUMAN e LI, 2012).

Diversas vias de sinalização intracelular podem culminar com a ativação do fator de transcrição CREB, que levará a um aumento da transcrição e tradução do BDNF, entre elas, destaca-se PKA, PKC, CAMKII, Ras-Raf-ERK, PI3K e GSK-3 β (HASHIMOTO, SHIMIZU e IYO, 2004; MALBERG, 2004; TARDITO *et al.*, 2006). O presente estudo demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo do zinco

(administrado agudamente) no TSC foi impedido quando se administrou inibidores da PKA (H-89), PKC (queleritrina), CAMKII (KN-62), MEK1/2 (PD98059 e U0126) e PI3K (LY294002). Além disso, foi encontrado um efeito sinérgico com a coadministração de doses subativas de $ZnCl_2$ com um inibidor da GSK-3 β (AR-A014418). Dessa forma, esses dados sugerem que o efeito tipo-antidepressivo do zinco pode depender, pelo menos em parte, da ativação das vias da PKA, PKC, CAMKII, ERK, PI3K e GSK-3 β . Recentemente, um estudo da literatura confirmou parte dos dados encontrados nesse estudo, demonstrando que inibidores da PI3K, PKA e PKC também impediram o efeito tipo-antidepressivo do zinco em ratos (SZEWCZYK *et al.*, 2015). É interessante ressaltar que, como abordado em uma revisão, o zinco pode ativar a via da ERK/BDNF por vários mecanismos, entre eles: a) zinco se liga em receptor GPR39, culminando com uma ativação da ERK; b) zinco inibe fosfatase que iria desfosforilar a ERK, permitindo que a ERK fique fosforilada (ativa); c) zinco inibe cinases (Csk – que por sua vez inibe a SFK), ativando a fosforilação do TrkB; d) zinco ativa metaloproteínas que podem aumentar a conversão do pró-BDNF em BDNF maduro (NUTTALL e OTEIZA, 2012).

Embora as vias da PKA, PKC, CAMKII, ERK, PI3K e GSK-3 β possam culminar na ativação do BDNF, no presente trabalho, o $ZnCl_2$ administrado de maneira aguda (1 h antes da decapitação), não foi efetivo em alterar o imunoconteúdo do BDNF e nem a fosforilação do CREB em duas regiões cerebrais específicas (hipocampo e córtex pré-frontal). Embora o tratamento agudo com cetamina (um antagonista de receptores NMDA que possui ação antidepressiva) aumente os níveis de BDNF no hipocampo e córtex de ratos (GARCIA *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2014), a administração aguda de antidepressivos clássicos, semelhante ao presente trabalho, não é capaz de aumentar os níveis de BDNF no hipocampo ou na região cerebrocortical (BALU *et al.*, 2008). Por outro lado, o tratamento crônico tanto com antidepressivo (DE FOUBERT *et al.*, 2004) quanto com zinco (SOWA-KUCMA *et al.*, 2008; CIESLIK *et al.*, 2011) são capazes que aumentar os níveis de BDNF. Entretanto, vale destacar que um recente trabalho demonstrou que, em ratos, o tratamento agudo com zinco aumentou o BDNF no córtex pré-frontal quando o zinco foi administrado 3 horas antes da decapitação (SZEWCZYK *et al.*, 2015). Além disso, o mesmo trabalho demonstrou que o zinco também aumentou proteínas sinápticas (GluA1 e sinapsina 1) quando administrado 3 horas antes e a fosforilação da mTOR quando administrado 30 minutos e 3 horas antes (SZEWCZYK *et al.*, 2015). Isso sugere que o zinco pode agir, pelo menos em parte,

através da ativação de vias intracelulares envolvidas com a sinalização do BDNF.

Algumas das vias de sinalização acima comentadas, como a ERK, PI3K, Akt e PKC podem culminar com a ativação de outro fator de transcrição – o Nrf2 (NAKASO *et al.*, 2003; KORMOSH, LAKTIONOV e ANTOSHECHKINA, 2006; MENG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013a; ZOU *et al.*, 2013). O Nrf2 por sua vez, aumenta a transcrição de vários genes, como o da HO-1 (SCHIPPER, 2000; RYTER e CHOI, 2015). Digno de nota, as vias da PI3K/Akt e ERK regulam também, pelo menos *in vitro*, a expressão da HO-1 (WU *et al.*, 2006; MO *et al.*, 2012). Recentemente, dados da literatura também demonstraram que a via da Nrf2/HO-1 pode estar envolvida na fisiopatologia da depressão, bem como na resposta de alguns antidepressivos (MARTIN-DE-SAAVEDRA *et al.*, 2013; RYBKA *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2015; MENDEZ-DAVID *et al.*, 2015). Dessa forma, como os resultados do capítulo I demonstraram o envolvimento de algumas vias de sinalização que também podem culminar com a ativação da via Nrf2/HO-1, resolveu-se investigar se o inibidor ou o indutor da HO-1 também podiam alterar os efeitos comportamentais do zinco no TSC. Os dados apresentados no capítulo II evidenciaram que o inibidor da HO-1 (ZnPP) impediu o efeito tipo-antidepressivo do zinco e que dose subativa de indutor da HO-1 (CoPP) associado com dose subativa de ZnCl₂ exercem um efeito sinérgico na diminuição do tempo de imobilidade no TSC. Além disso, a administração aguda de zinco aumentou a expressão da HO-1 no córtex pré-frontal. Vale destacar que já foi demonstrado que animais alimentados com dieta deficiente em zinco apresentam uma diminuição na translocação do Nrf2 para o núcleo (OMATA *et al.*, 2013). Adicionalmente, o silenciamento (10-20%) do receptor do zinco GPR39, diminui os níveis da HO-1 em 50%, pelo menos periféricamente (ROMANOSKI *et al.*, 2011), reforçando os achados de via o zinco influencia na via da Nrf2/HO-1.

Vale destacar que a superexpressão da HO-1 pode estar associada com um aumento nos níveis de BDNF e do seu receptor TrkB (QI *et al.*, 2014). Além disso, já foi demonstrado que o zinco pode aumentar a transativação (aumento da ativação através de um intermediário) do TrkB (por um mecanismo independente da neurotrofina), influenciando na potenciação de longa duração na região CA3 hipocampal. Por outro lado, uma deleção do TrkB, uma inibição da atividade cinase desse receptor ou o uso de um quelante de zinco prejudicaram a potenciação de longa duração, sugerindo que a ação do zinco no hipocampo pode envolver o TrkB (HUANG *et al.*, 2008). Assim, o presente trabalho

também investigou se o antagonista do TrkB (K-252a) também podia influenciar no efeito comportamental do zinco. Confirmando a hipótese, dados apresentados no capítulo II também demonstraram que o efeito tipo-antidepressivo do zinco no TSC é dependente, pelo menos em parte, da ativação dos receptores TrkB. É interessante observar que já foi demonstrado que a silenciamento do gene do receptor GPR39 (em 10-20% em relação ao controle) diminui os níveis basais da HO-1 em torno de 50% (ROMANOSKI *et al.*, 2011). Dessa forma, uma hipótese levantada após os dados apresentados nos capítulos I e II é que o envolvimento da HO-1 no efeito tipo-antidepressivo do zinco possa envolver o próprio receptor do zinco GPR39, bem como a via do BDNF e seus receptores, embora estudos adicionais precisam ser realizados para se confirmar essa hipótese.

Outra questão muito correlacionada com a depressão é o estresse crônico. Sabe-se que o estresse crônico é capaz de induzir falhas nos mecanismos de retroalimentação negativa no eixo HPA, levando a uma hiperativação do eixo HPA, culminando com um aumento no cortisol. Essas modificações podem influenciar nas funções de vários órgãos, incluindo a funcionalidade do encéfalo, levando a alterações celulares, moleculares e estruturais que podem culminar com o aparecimento ou piora dos sintomas depressivos (KYROU e TSIGOS, 2009; DURIC e DUMAN, 2013). Sendo assim, o capítulo III objetivou investigar os efeitos do zinco em um modelo de estresse crônico imprevisível. Os resultados do presente estudo corroboram essas informações do papel do estresse na fisiopatologia da depressão, demonstrando que o protocolo de estresse crônico imprevisível foi capaz de induzir a um comportamento tipo-depressivo no TSC. Além disso, foi demonstrado que o zinco pode impedir essa alteração comportamental induzida pelo estresse. Embora o efeito tipo-antidepressivo do zinco já tenha sido demonstrado em diversos estudos, foi a primeira vez que esse mineral teve efeito em protocolo de estresse crônico imprevisível em camundongos, embora já tenha sido demonstrado resultado semelhante em ratos (CIESLIK *et al.*, 2007; CIESLIK *et al.*, 2011).

Dentre as diversas alterações que o estresse pode causar, destaca-se a diminuição dos níveis de BDNF (FILHO *et al.*, 2015), bem como o aumento dos níveis de glutamato extracelular (CHARNEY e MANJI, 2004) ou alteração na neurotransmissão glutamatérgica em regiões cerebrais como o córtex pré-frontal e hipocampo (POPOLI *et al.*, 2012). Vale destacar que o excesso de glutamato é prejudicial ao encéfalo, estando relacionado com diversas patologias e transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão (SANACORA *et al.*, 2008; ZARATE *et al.*, 2010;

HILLHOUSE e PORTER, 2015). Dessa forma, o presente estudo investigou os efeitos da excitotoxicidade induzida por glutamato, bem como o imunoconteúdo de proteínas envolvidas na neurotransmissão glutamatérgica no modelo de estresse crônico imprevisível.

O imunoconteúdo hipocampal do GLT-1 e do GFAP também não foi alterado nem pelo protocolo de estresse crônico imprevisível, nem pelo tratamento dos animais. Dados da literatura ainda são controversos em relação ao envolvimento do GLT-1 na depressão. Enquanto alguns estudos com diferentes protocolos de estresse mostram um aumento de GLT-1 (REAGAN *et al.*, 2004; AUTRY *et al.*, 2006), outros estudos demonstram uma diminuição nos níveis de GLT-1 (GOURLEY *et al.*, 2012; IMBE *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2014). Já os estudos com GFAP, demonstram que protocolos de estresse propiciam uma diminuição nos níveis de GFAP (BANASR e DUMAN, 2008; LIU *et al.*, 2009; BANASR *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; IMBE *et al.*, 2012). Esses dados controversos podem ter ocorrido, pelo menos em parte, pelas diferenças nos protocolos dos estudos.

Em contrapartida, o presente trabalho demonstrou que o imunoconteúdo hipocampal do EAAC1 (presente principalmente em neurônios do hipocampo, sendo importante para captar o glutamato da fenda sináptica e, principalmente, para transportar cisteína para dentro do neurônio) foi aumentado nos animais submetidos ao estresse, bem como nos animais que receberam o tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina (estressados e não stressados). A investigação do EAAC1 na depressão ainda é escassa e os poucos estudos disponíveis na literatura são controversos, pois há relatos de uma diminuição na expressão do RNAm do EAAC1 na prole que foi stressada no período pré-natal (ZHANG *et al.*, 2013b), bem como de nenhuma mudança na expressão dessa proteína (ZINK *et al.*, 2011). Assim, o aumento do EAAC1 exercido pelo tratamento com zinco e fluoxetina podem culminar com um possível aumento nos níveis de glutamato e, principalmente, de cisteína para dentro do neurônio. Dessa forma, esse aumento do EAAC-1 poderia culminar em um aumento nos níveis de glutatona dentro no neurônio pós-sináptico, protegendo o neurônio do estresse oxidativo, embora mais estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese. Por outro lado, acredita-se que o aumento do EAAC1 nos animais stressados seja um efeito compensatório em resposta às alterações que o estresse podem ocasionar. Vale destacar que em um estudo utilizando o mesmo protocolo de estresse crônico imprevisível, foi demonstrado que o estresse crônico imprevisível por 14 dias diminuiu os níveis de glutatona no córtex pré-frontal mas não no hipocampo (MORETTI *et*

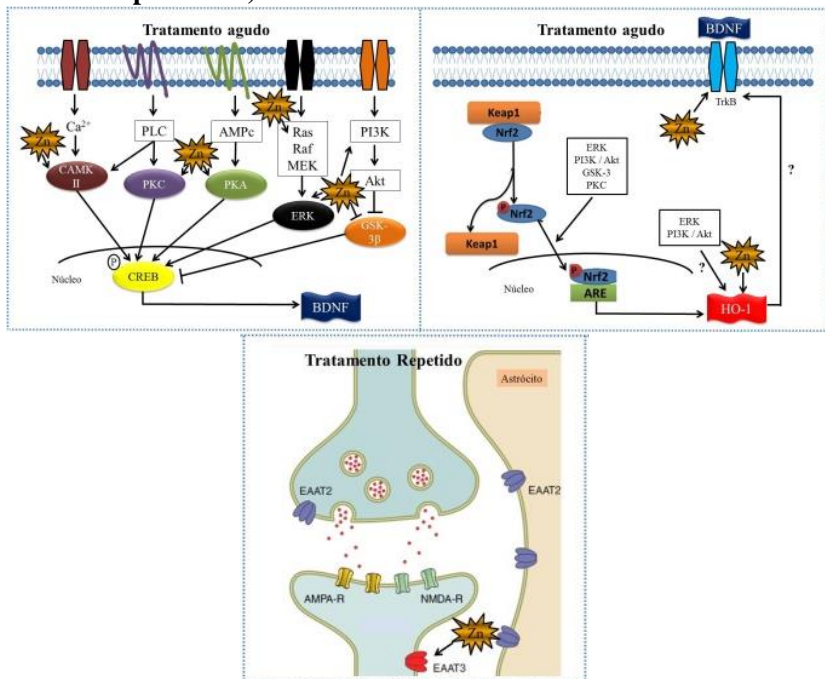
al., 2012). Sendo, assim, acredita-se que a não alteração dos níveis de glutathiona no hipocampo sejam devido ao aumento do ECCA-1 observado nesse capítulo, entretanto, mais estudos são necessários para confirmar essas hipóteses.

Como a ativação da Akt é um dos mecanismos que podem culminar com a translocação do EAAC1 para a membrana celular (KRIZMAN-GENDA *et al.*, 2005; NIEOULLON *et al.*, 2006), também foi investigado se a sua fosforilação ou o imunoconteúdo total hipocampal estavam alterados. Embora a fosforilação não tenha sofrido influência, o imunoconteúdo da Akt total foi aumentado em animais submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível e em animais que receberam $ZnCl_2$ (estressados ou não stressados). Dessa forma, sugere-se que o efeito antidepressivo do zinco neste protocolo possa ser devido, pelo menos em parte, à modulação da neurotransmissão glutamatérgica. Por outro lado, o aumento do EAAC1 exercido pela fluoxetina não parece depender da Akt, necessitando de estudos posteriores para melhor investigação dos mecanismos de ação.

Em relação ao modelo de toxicidade induzida por glutamato, foi demonstrado que a viabilidade celular das fatias hipocampais que receberam glutamato foi diminuída, sem apresentar diferenças entre as fatias de animais que foram submetidos ou não ao protocolo de estresse crônico imprevisível. Ou seja, o protocolo de estresse crônico imprevisível realizado não potencializou e nem impediu os efeitos do glutamato. Por outro lado, o tratamento com $ZnCl_2$ ou fluoxetina revelou uma tendência em impedir a redução da viabilidade celular induzida por glutamato (tanto nos animais stressados quanto nos não stressados).

Com base no encontrado nos capítulos I, II e III, a **Figura 16** apresenta, de maneira esquemática, algumas das vias pela qual o zinco pode agir melhorando os sintomas da depressão.

Figura 16. Possíveis mecanismos de ação implicados no efeito tipo-antidepressivo do zinco verificados a partir de experimentos agudos ou de um modelo crônico de depressão (protocolo de estresse crônico imprevisível)



Legenda: Do lado esquerdo e direito, na parte superior da figura, observa-se os principais alvos de ação do zinco quando administrado agudamente, demonstrando que parte das ações tipo-antidepressiva do zinco no TSC é devido à ativação da CAMKII, PKC, PKA, ERK, PI3K, inibição da GSK-3 β , ativação da HO-1 e do receptor TrkB. Na parte inferior da figura, observa-se o aumento do imunocontéudo do EAAT3/EAAC1 quando o zinco é administrado por 7 dias em animais submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível (14 dias). Abreviaturas: Akt, proteína cinase B; AMPA-R, receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole-propionato; AMPc, 3,5'-monofosfato de adenosina cíclico; ARE, elemento de resposta a antioxidantes; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; CAMKII, proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; GSK-3 β , glicogênio sintase cinase 3 β ; EAAT, transportador de aminoácido excitatório; ERK, proteína cinase regulada por sinal extracelular; HO-1, heme oxigenase-1; Keap1,

Kelch-like-ECH-associated protein 1; NMDA-R, receptor N-metil-D-aspartato; Nrf2, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinase; PLC, fosfolipase C; Raf, fator associado ao Ras; Ras, proteína de ligação ao GTP; TrkB, receptor tropomiosina cinase B; Zn, zinco. Fonte: adaptado de Chen, Zhang e Cai (CHEN, ZHANG e CAI, 2014), Hashimoto, Shimizu e Iyo (2004) e de Vandenberg e Ryan (2013).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho ampliou os conhecimentos acerca dos mecanismos de ação envolvidos no efeito tipo-antidepressivo do zinco, além de reforçar o seu potencial no tratamento da depressão. Na primeira parte desse estudo, foi demonstrado que o efeito tipo-antidepressivo do zinco administrado agudamente é impedido pela administração de inibidores da PKA, PKC, CAMKII, MEK1/2 e PI3K. Além disso, observou-se um efeito tipo-antidepressivo sinérgico após a associação de doses subativas de $ZnCl_2$ e do inibidor da GSK-3 β . Sendo assim, essa primeira parte dos resultados sugere que a ação tipo-antidepressiva do zinco está relacionada, pelo menos em parte, com essas vias de sinalização intracelular que culminam com a ativação do fator de transcrição CREB. Embora o CREB possa aumentar o BDNF, o tratamento agudo com $ZnCl_2$ (1 hora antes da decapitação) não alterou a fosforilação do CREB e nem no imunoconteúdo de BDNF. Dessa forma, acredita-se que seja necessário um período maior de tempo para que ocorra um aumento do BDNF ou que isso ocorra em regiões ou tipo celular específicos.

Reforçando o envolvimento da via do BDNF no efeito comportamental exercido pelo zinco, a administração aguda de um antagonista do receptor TrkB foi capaz de impedir o efeito tipo-antidepressivo do zinco. Ainda em experimentos agudos, foi demonstrado que a ativação da HO-1 também é importante para o efeito tipo-antidepressivo do zinco, já que o inibidor da HO-1 impediu a diminuição do tempo de imobilidade provocado pelo zinco no TSC e o indutor da HO-1 exerceu efeito sinérgico com uma dose subativa de $ZnCl_2$ no TSC. Além disso, o tratamento agudo com $ZnCl_2$ aumentou o imunoconteúdo da HO-1 no córtex pré-frontal de camundongos. Dessa forma, a hipótese é que a via de sinalização envolvendo a HO-1 influencia no efeito tipo-antidepressivo do zinco principalmente no córtex pré-frontal.

Em seguida, foi demonstrado o efeito do tratamento do $ZnCl_2$ (por 7 dias) no modelo de estresse crônico imprevisível. Nesse modelo, foi evidenciado que o zinco impede o efeito tipo-depressivo induzido pelo protocolo de estresse crônico imprevisível. Quando fatias hipocâmpais desses animais foram incubadas *ex-vivo* com glutamato, houve uma diminuição na viabilidade celular em todos os grupos. Entretanto, observou-se uma tendência do tratamento (principalmente do $ZnCl_2$) em impedir a diminuição da viabilidade celular. Além disso, o

zinc aumentou o imunocontéudo do EAAC1 e da Akt no hipocampo, sugerindo que parte das ações do zinco seja pela modulação da neurotransmissão glutamatérgica, embora não tenha ocorrido nenhuma alteração no imunocontéudo hipocampal do GLT-1 e GFAP (que está envolvida tanto com astrogliose quanto com o tráfego e expressão celular dos transportadores de glutamato). Além disso, o aumento do EAAC1 sugere que o zinco possa aumentar os níveis de glutathione dentro do neurônio, embora mais estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese.

Até o momento, o presente estudo ampliou os dados da literatura sobre os mecanismos de ação envolvidos na ação tipo-antidepressiva do zinco, demonstrando que esse mineral influencia em vias de sinalização que culminam com a ativação do CREB/BDNF e da HO-1. Além disso, parte dos efeitos do zinco também podem envolver proteínas relacionadas na neurotransmissão glutamatérgica. Dessa forma, reforçam-se os dados sobre a utilização do zinco para auxiliar no tratamento da depressão.

7 PERSPECTIVAS

Avaliar, por Western blotting, o efeito da administração aguda do $ZnCl_2$ na fosforilação da ERK1/2 no hipocampo e córtex pré-frontal 1h, 3h e 24h após a administração.

Avaliar, por Western blotting, o efeito da administração aguda do $ZnCl_2$ nos níveis de BDNF, pró-BDNF e fosforilação do CREB no hipocampo e córtex pré-frontal 3h e 24 h após a administração.

Avaliar, por imunohistoquímica, o efeito da administração aguda do $ZnCl_2$ nos níveis de BDNF, pró-BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal 1h, 3h e 24 h após a administração do $ZnCl_2$.

Investigar o efeito agudo do $ZnCl_2$ no imunoconteúdo do receptor TrkB (formas total e fosforilada).

Avaliar se o inibidor do receptor TrkB é capaz de impedir os efeitos do $ZnCl_2$ no aumento do imunoconteúdo da HO-1 no córtex pré-frontal.

Investigar se a administração de $ZnCl_2$ é capaz de provocar efeito tipo-antidepressivo em camundongos *knockout* para Nrf2.

Avaliar o imunoconteúdo e atividade da glutatona peroxidase e glutatona redutase após a administração subcrônica e aguda do $ZnCl_2$, bem como no protocolo de estresse crônico imprevisível.

Avaliar a liberação e captação do glutamato no protocolo de estresse crônico imprevisível, bem como o efeito do $ZnCl_2$.

Analisar a ação do estresse crônico imprevisível e do tratamento com zinco na viabilidade celular de fatiais do córtex pré-frontal expostas ao glutamato.

REFERÊNCIAS

- AAN HET ROT, M.; COLLINS, K. A.; MURROUGH, J. W. *et al.* Safety and efficacy of repeated-dose intravenous ketamine for treatment-resistant depression. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 139-45, 2010.
- ABDUL AZIZ, N. H.; KENDALL, D. A.; PARDON, M. C. Prenatal exposure to chronic mild stress increases corticosterone levels in the amniotic fluid and induces cognitive deficits in female offspring, improved by treatment with the antidepressant drug amitriptyline. **Behav Brain Res**, v. 231, n. 1, p. 29-39, 2012.
- ABRIAL, E.; LUCAS, G.; SCARNA, H. *et al.* A role for the PKC signaling system in the pathophysiology and treatment of mood disorders: involvement of a functional imbalance? **Mol Neurobiol**, v. 44, n. 3, p. 407-19, 2011.
- ADVANI, T.; KOEK, W.; HENSLER, J. G. Gender differences in the enhanced vulnerability of BDNF+/- mice to mild stress. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 12, n. 5, p. 583-8, 2009.
- ALBONI, S.; TASCEDDA, F.; CORSINI, D. *et al.* Stress induces altered CRE/CREB pathway activity and BDNF expression in the hippocampus of glucocorticoid receptor-impaired mice. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 7-8, p. 1337-46, 2011.
- ALME, M. N.; WIBRAND, K.; DAGESTAD, G. *et al.* Chronic fluoxetine treatment induces brain region-specific upregulation of genes associated with BDNF-induced long-term potentiation. **Neural Plast**, v. 2007, p. 26496, 2007.
- ALMEIDA, R. C.; SOUZA, D. G.; SOLETTI, R. C. *et al.* Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. **Neurosci Lett**, v. 395, n. 2, p. 93-7, 2006.
- AMANI, R.; SAEIDI, S.; NAZARI, Z. *et al.* Correlation between dietary zinc intakes and its serum levels with depression scales in young female students. **Biol Trace Elem Res**, v. 137, n. 2, p. 150-8, 2010.
- AN, W. L.; PEI, J. J.; NISHIMURA, T. *et al.* Zinc-induced anti-apoptotic effects in SH-SY5Y neuroblastoma cells via the extracellular signal-regulated kinase 1/2. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 135, n. 1-2, p. 40-7, 2005.
- ANACKER, C.; ZUNZAIN, P. A.; CATTANEO, A. *et al.* Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. **Mol Psychiatry**, v. 16, n. 7, p. 738-50, 2011.
- AOYAMA, K.; SUH, S. W.; HAMBY, A. M. *et al.* Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. **Nat Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 119-26, 2006.

ARNONE, D.; MCKIE, S.; ELLIOTT, R. *et al.* State-dependent changes in hippocampal grey matter in depression. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 12, p. 1265-72, 2013.

ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. Arlington: 2013.

AUTRY, A. E.; GRILLO, C. A.; PIROLI, G. G. *et al.* Glucocorticoid regulation of GLT-1 glutamate transporter isoform expression in the rat hippocampus. **Neuroendocrinology**, v. 83, n. 5-6, p. 371-9, 2006.

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

BACHIS, A.; CRUZ, M. I.; NOSHENY, R. L. *et al.* Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. **Neurosci Lett**, v. 442, n. 2, p. 104-8, 2008.

BALU, D. T.; HOSHAW, B. A.; MALBERG, J. E. *et al.* Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments. **Brain Res**, v. 1211, p. 37-43, 2008.

BANASR, M.; CHOWDHURY, G. M.; TERWILLIGER, R. *et al.* Glial pathology in an animal model of depression: reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. **Mol Psychiatry**, v. 15, n. 5, p. 501-11, 2010.

BANASR, M.; DUMAN, R. S. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 10, p. 863-70, 2008.

BAO, B.; PRASAD, A. S.; BECK, F. W. *et al.* Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 6, p. 1634-41, 2010.

BARAKA, A. M.; HASSAB EL NABI, W.; EL GHOTNI, S. Investigating the role of zinc in a rat model of epilepsy. **CNS Neurosci Ther**, v. 18, n. 4, p. 327-33, 2012.

BARANANO, D. E.; SNYDER, S. H. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 10996-1002, 2001.

BARTHEL, A.; OSTRAKHOVITCH, E. A.; WALTER, P. L. *et al.* Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: mechanisms and consequences. **Arch Biochem Biophys**, v. 463, n. 2, p. 175-82, 2007.

- BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 327-47, 2009.
- BEAULIEU, J. M.; ZHANG, X.; RODRIGUIZ, R. M. *et al.* Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 4, p. 1333-8, 2008.
- BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C.; FREY, B. N. Preclinical and clinical evidence of antioxidant effects of antidepressant agents: implications for the pathophysiology of major depressive disorder. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 609421, 2012.
- BELZUNG, C.; LEMOINE, M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. **Biol Mood Anxiety Disord**, v. 1, n. 1, p. 9, 2011.
- BERMAN, R. M.; CAPIELLO, A.; ANAND, A. *et al.* Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 351-4, 2000.
- BERNARD, R.; KERMAN, I. A.; THOMPSON, R. C. *et al.* Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression. **Mol Psychiatry**, v. 16, n. 6, p. 634-46, 2011.
- BESSER, L.; CHORIN, E.; SEKLER, I. *et al.* Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 29, n. 9, p. 2890-901, 2009.
- BET, P. M.; HUGTENBURG, J. G.; PENNINX, B. W. *et al.* Side effects of antidepressants during long-term use in a naturalistic setting. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 11, p. 1443-51, 2013.
- BEYERSMANN, D.; HAASE, H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. **Biometals**, v. 14, n. 3-4, p. 331-41, 2001.
- BHAGWAGAR, Z.; HAFIZI, S.; COWEN, P. J. Increased salivary cortisol after waking in depression. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 182, n. 1, p. 54-7, 2005.
- BIANCHI, M. G.; BARDELLI, D.; CHIU, M. *et al.* Changes in the expression of the glutamate transporter EAAT3/EAAC1 in health and disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 11, p. 2001-15, 2014.
- BIERHAUS, A.; WOLF, J.; ANDRASSY, M. *et al.* A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1920-5, 2003.

BISHOP, G. M.; SCHEIBER, I. F.; DRINGEN, R. *et al.* Synergistic accumulation of iron and zinc by cultured astrocytes. **J Neural Transm**, v. 117, n. 7, p. 809-17, 2010.

BLACK, C. N.; BOT, M.; SCHEFFER, P. G. *et al.* Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164-75, 2015.

BLIER, P.; EL MANSARI, M. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 368, n. 1615, p. 20120536, 2013.

BOCCHIO-CHIAVETTO, L.; BAGNARDI, V.; ZANARDINI, R. *et al.* Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. **World J Biol Psychiatry**, v. 11, n. 6, p. 763-73, 2010.

BOOIJ, L.; VAN DER DOES, A. J.; RIEDEL, W. J. Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. **Mol Psychiatry**, v. 8, n. 12, p. 951-73, 2003.

BOURIN, M.; MASSE, F.; HASCOET, M. Evidence for the activity of lamotrigine at 5-HT(1A) receptors in the mouse forced swimming test. **J Psychiatry Neurosci**, v. 30, n. 4, p. 275-82, 2005.

BRIDGES, R. J.; ESSLINGER, C. S. The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. **Pharmacol Ther**, v. 107, n. 3, p. 271-85, 2005.

BRIDGES, R. J.; NATALE, N. R.; PATEL, S. A. System xc(-) cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 1, p. 20-34, 2012.

BROCARDO, P. S.; ASSINI, F.; FRANCO, J. L. *et al.* Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. **Toxicol Sci**, v. 97, n. 1, p. 140-8, 2007.

BROWN, E. S.; VARGHESE, F. P.; MCEWEN, B. S. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 1, p. 1-9, 2004.

BRUNONI, A. R.; LOPES, M.; FREGNI, F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 8, p. 1169-80, 2008.

BUDNI, J.; LOBATO, K. R.; BINFARE, R. W. *et al.* Involvement of PI3K, GSK-3beta and PPARgamma in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 5, p. 714-23, 2011.

BUDNI, J.; ZOMKOWSKI, A. D.; ENGEL, D. *et al.* Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Exp Neurol**, v. 240, p. 112-21, 2013.

CALKINS, M. J.; JOHNSON, D. A.; TOWNSEND, J. A. *et al.* The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 3, p. 497-508, 2009.

CAMPBELL, S.; MACQUEEN, G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 6, p. 417-26, 2004.

CAMPBELL, S.; MARRIOTT, M.; NAHMIAS, C. *et al.* Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 4, p. 598-607, 2004.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1655-7, 2002.

CAO, L.; LI, L.; ZUO, Z. N-acetylcysteine reverses existing cognitive impairment and increased oxidative stress in glutamate transporter type 3 deficient mice. **Neuroscience**, v. 220, p. 85-9, 2012.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 235-72, 2003.

CASTREN, E. Is mood chemistry? **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 241-6, 2005.

CASTREN, E.; RANTAMAKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. **Dev Neurobiol**, v. 70, n. 5, p. 289-97, 2010.

CHAN, S. W.; HARMER, C. J.; NORBURY, R. *et al.* Hippocampal volume in vulnerability and resilience to depression. **J Affect Disord**, v. 189, p. 199-202, 2016.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 37-40, 2001.

CHANOIT, G.; LEE, S.; XI, J. *et al.* Exogenous zinc protects cardiac cells from reperfusion injury by targeting mitochondrial permeability transition pore through inactivation of glycogen synthase kinase-3beta. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 295, n. 3, p. H1227-H1233, 2008.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 299-309, 2003.

CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. **Sci STKE**, v. 2004, n. 225, p. re5, 2004.

CHEN, B.; DOWLATSHAHI, D.; MACQUEEN, G. M. *et al.* Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260-5, 2001.

CHEN, J.; ZHANG, Z.; CAI, L. Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. **Diabetes Metab J**, v. 38, n. 5, p. 337-45, 2014.

CHEN, J. X.; YAO, L. H.; XU, B. B. *et al.* Glutamate transporter 1-mediated antidepressant-like effect in a rat model of chronic unpredictable stress. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 34, n. 6, p. 838-44, 2014.

CHEN, K.; GUNTER, K.; MAINES, M. D. Neurons overexpressing heme oxygenase-1 resist oxidative stress-mediated cell death. **J Neurochem**, v. 75, n. 1, p. 304-13, 2000.

CHEN, L.; LAWLOR, D. A.; LEWIS, S. J. *et al.* Genetic association study of BDNF in depression: finding from two cohort studies and a meta-analysis. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 147B, n. 6, p. 814-21, 2008.

CHEN, M. J.; NGUYEN, T. V.; PIKE, C. J. *et al.* Norepinephrine induces BDNF and activates the PI-3K and MAPK cascades in embryonic hippocampal neurons. **Cell Signal**, v. 19, n. 1, p. 114-28, 2007.

CHEN, Y.; SWANSON, R. A. The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. **J Neurochem**, v. 84, n. 6, p. 1332-9, 2003.

CHESNEY, E.; GOODWIN, G. M.; FAZEL, S. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. **World Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 153-60, 2014.

CHILUKURI, H.; REDDY, N. P.; PATHAPATI, R. M. *et al.* Acute antidepressant effects of intramuscular versus intravenous ketamine. **Indian J Psychol Med**, v. 36, n. 1, p. 71-6, 2014.

CHOI, D. W.; KOH, J. Y. Zinc and brain injury. **Annu Rev Neurosci**, v. 21, p. 347-75, 1998.

CHOI, D. W.; YOKOYAMA, M.; KOH, J. Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. **Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 67-79, 1988.

CHORIN, E.; VINOGRAD, O.; FLEIDERVISH, I. *et al.* Upregulation of KCC2 activity by zinc-mediated neurotransmission via the mZnR/GPR39 receptor. **J Neurosci**, v. 31, n. 36, p. 12916-26, 2011.

CHOUDARY, P. V.; MOLNAR, M.; EVANS, S. J. *et al.* Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 43, p. 15653-8, 2005.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244-52, 1992.

CHUNG, C. P.; SCHMIDT, D.; STEIN, C. M. *et al.* Increased oxidative stress in patients with depression and its relationship to treatment. **Psychiatry Res**, v. 206, n. 2-3, p. 213-6, 2013.

CICHY, A.; SOWA-KUCMA, M.; LEGUTKO, B. *et al.* Zinc-induced adaptive changes in NMDA/glutamatergic and serotonergic receptors. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 6, p. 1184-91, 2009.

CIESLIK, K.; KLENK-MAJEWSKA, B.; DANILCZUK, Z. *et al.* Influence of zinc supplementation on imipramine effect in a chronic unpredictable stress (CUS) model in rats. **Pharmacol Rep**, v. 59, n. 1, p. 46-52, 2007.

CIESLIK, K.; SOWA-KUCMA, M.; OSSOWSKA, G. *et al.* Chronic unpredictable stress-induced reduction in the hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is antagonized by zinc treatment. **Pharmacol Rep**, v. 63, n. 2, p. 537-43, 2011.

CIPRIANI, A.; FURUKAWA, T. A.; SALANTI, G. *et al.* Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. **Lancet**, v. 373, n. 9665, p. 746-58, 2009.

CIRILLO, G.; BIANCO, M. R.; COLANGELO, A. M. *et al.* Reactive astrocytosis-induced perturbation of synaptic homeostasis is restored by nerve growth factor. **Neurobiol Dis**, v. 41, n. 3, p. 630-9, 2011.

COHEN, P. The hormonal control of glycogen metabolism in mammalian muscle by multivalent phosphorylation. **Biochem Soc Trans**, v. 7, n. 3, p. 459-80, 1979.

COLANGELO, A. M.; ALBERGHINA, L.; PAPA, M. Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. **Neurosci Lett**, v. 565, p. 59-64, 2014.

COLVIN, R. A.; FONTAINE, C. P.; LASKOWSKI, M. *et al.* Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 479, n. 1-3, p. 171-85, 2003.

COPE, E. C.; LEVENSON, C. W. Role of zinc in the development and treatment of mood disorders. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 13, n. 6, p. 685-9, 2010.

CORNIOLA, R. S.; TASSABEHJI, N. M.; HARE, J. *et al.* Zinc deficiency impairs neuronal precursor cell proliferation and induces apoptosis via p53-mediated mechanisms. **Brain Res**, v. 1237, p. 52-61, 2008.

CORONA, C.; PENSALFINI, A.; FRAZZINI, V. *et al.* New therapeutic targets in Alzheimer's disease: brain deregulation of calcium and zinc. **Cell Death Dis**, v. 2, p. e176, 2011.

CORTES-VIEYRA, R.; BRAVO-PATINO, A.; VALDEZ-ALARCON, J. J. *et al.* Role of glycogen synthase kinase-3 beta in the inflammatory response caused by bacterial pathogens. **J Inflamm (Lond)**, v. 9, n. 1, p. 23, 2012.

CORTESE, M. M.; SUSCHEK, C. V.; WETZEL, W. *et al.* Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 12, p. 2002-12, 2008.

COUSINS, R. J.; LIUZZI, J. P.; LICHTEN, L. A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. **J Biol Chem**, v. 281, n. 34, p. 24085-9, 2006.

COYLE, J. T.; DUMAN, R. S. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. **Neuron**, v. 38, n. 2, p. 157-60, 2003.

CROCHEMORE, C.; LU, J.; WU, Y. *et al.* Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. **Mol Psychiatry**, v. 10, n. 8, p. 790-8, 2005.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBEBEAU, 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, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. Animal models of mood disorders: Recent developments. **Curr Opin Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2007.

CSERMELY, P.; SZAMEL, M.; RESCH, K. *et al.* Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. **J Biol Chem**, v. 263, n. 14, p. 6487-90, 1988.

- CUNHA, C.; BRAMBILLA, R.; THOMAS, K. L. A simple role for BDNF in learning and memory? **Front Mol Neurosci**, v. 3, p. 1, 2010.
- CUNHA, M. P.; BUDNI, J.; LUDKA, F. K. *et al.* Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. **Mol Neurobiol**, v. 6, p. 1-15, 2015.
- CUNHA, M. P.; BUDNI, J.; PAZINI, F. L. *et al.* Involvement of PKA, PKC, CAMK-II and MEK1/2 in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. **Pharmacol Rep**, v. 66, n. 4, p. 653-9, 2014.
- CUNHA, M. P.; MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E. *et al.* Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 8, p. 1913-20, 2008.
- CVRCEK, P. Side effects of ketamine in the long-term treatment of neuropathic pain. **Pain Med**, v. 9, n. 2, p. 253-7, 2008.
- CZECH, B.; LUCASSEN, P. J. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 257, n. 5, p. 250-60, 2007.
- CZECH, B.; SIMON, M.; SCHMELTING, B. *et al.* Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 8, p. 1616-26, 2006.
- DAGDA, R. K.; DAS BANERJEE, T. Role of protein kinase A in regulating mitochondrial function and neuronal development: implications to neurodegenerative diseases. **Rev Neurosci**, v. 26, n. 3, p. 359-70, 2015.
- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.
- DAVID, D. J.; SAMUELS, B. A.; RAINER, Q. *et al.* Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479-93, 2009.
- DAVIS, S.; THOMAS, A.; PERRY, R. *et al.* Glial fibrillary acidic protein in late life major depressive disorder: an immunocytochemical study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 73, n. 5, p. 556-60, 2002.
- DE FOUBERT, G.; CARNEY, S. L.; ROBINSON, C. S. *et al.* Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. **Neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 597-604, 2004.
- DE OLIVEIRA KDE, J.; DONANGELO, C. M.; DE OLIVEIRA, A. V., JR. *et al.* Effect of zinc supplementation on the antioxidant, copper, and iron status of physically active adolescents. **Cell Biochem Funct**, v. 27, n. 3, p. 162-6, 2009.

DEDOVIC, K.; DUCHESNE, A.; ANDREWS, J. *et al.* The brain and the stress axis: the neural correlates of cortisol regulation in response to stress. **Neuroimage**, v. 47, n. 3, p. 864-71, 2009.

DELAY, J.; LAINE, B.; BUISSON, J. F. The action of isonicotinyl-hydrazide used in the treatment of depressive states. **Ann Med Psychol**, v. 110, p. 689-692, 1952.

DELGADO, P. L. Depression: the case for a monoamine deficiency. **J Clin Psychiatry**, v. 61 Suppl 6, p. 7-11, 2000.

DETANICO, B. C.; PIATO, A. L.; FREITAS, J. J. *et al.* Antidepressant-like effects of melatonin in the mouse chronic mild stress model. **Eur J Pharmacol**, v. 607, n. 1-3, p. 121-5, 2009.

DETTENBORN, L.; MUHTZ, C.; SKOLUDA, N. *et al.* Introducing a novel method to assess cumulative steroid concentrations: increased hair cortisol concentrations over 6 months in medicated patients with depression. **Stress**, v. 15, n. 3, p. 348-53, 2012.

DEUSCHLE, M.; SCHWEIGER, U.; WEBER, B. *et al.* Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary-adrenal system in male depressed patients and healthy controls. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 1, p. 234-8, 1997.

DEUTSCHENBAUR, L.; BECK, J.; KIYHANKHADIV, A. *et al.* Role of calcium, glutamate and NMDA in major depression and therapeutic application. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 64, p. 325-33, 2016.

DING, Q.; LI, H.; TIAN, X. *et al.* Zinc and imipramine reverse the depression-like behavior in mice induced by chronic restraint stress. **J Affect Disord**, v. 197, p. 100-106, 2016.

DIVITO, C. B.; UNDERHILL, S. M. Excitatory amino acid transporters: roles in glutamatergic neurotransmission. **Neurochem Int**, v. 73, p. 172-80, 2014.

DOBOSZEWSKA, U.; SOWA-KUCMA, M.; MLYNIEC, K. *et al.* Zinc deficiency in rats is associated with up-regulation of hippocampal NMDA receptor. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 56, p. 254-263, 2014.

DOBOSZEWSKA, U.; SZEWCZYK, B.; SOWA-KUCMA, M. *et al.* Antidepressant activity of fluoxetine in the zinc deficiency model in rats involves the NMDA receptor complex. **Behav Brain Res**, v. 287, p. 323-30, 2015.

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

DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Curr Opin Neurobiol**, v. 11, n. 2, p. 240-9, 2001.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Struct Funct**, v. 213, n. 1-2, p. 93-118, 2008.

DU, J.; SZABO, S. T.; GRAY, N. A. *et al.* Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 3, p. 243-8, 2004.

DUBEY, V. K.; ANSARI, F.; VOHORA, D. *et al.* Possible involvement of corticosterone and serotonin in antidepressant and antianxiety effects of chromium picolinate in chronic unpredictable mild stress induced depression and anxiety in rats. **J Trace Elem Med Biol**, v. 29, p. 222-6, 2015.

DUMAN, C. H.; SCHLESINGER, L.; KODAMA, M. *et al.* A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 661-70, 2007.

DUMAN, R. S. Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 157-69, 2004a.

_____. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromolecular Med**, v. 5, n. 1, p. 11-25, 2004b.

_____. Neurobiology of stress, depression, and rapid acting antidepressants: remodeling synaptic connections. **Depress Anxiety**, v. 31, n. 4, p. 291-6, 2014a.

_____. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 16, n. 1, p. 11-27, 2014b.

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**, v. 367, n. 1601, p. 2475-84, 2012.

DUMAN, R. S.; LI, N.; LIU, R. J. *et al.* Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 35-41, 2012.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116-27, 2006.

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

DURIC, V.; BANASR, M.; LICZNERSKI, P. *et al.* A negative regulator of MAP kinase causes depressive behavior. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1328-32, 2010.

DURIC, V.; DUMAN, R. S. Depression and treatment response: dynamic interplay of signaling pathways and altered neural processes. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 1, p. 39-53, 2013.

DWIVEDI, Y.; MONDAL, A. C.; RIZAVI, H. S. *et al.* Single and repeated stress-induced modulation of phospholipase C catalytic activity and expression: role in LH behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 473-83, 2005.

DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H. S.; CONLEY, R. R. *et al.* Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. **Arch Gen Psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 804-15, 2003.

DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H. S.; ROBERTS, R. C. *et al.* Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 916-28, 2001.

DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H. S.; TEPPEN, T. *et al.* Lower phosphoinositide 3-kinase (PI 3-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, n. 10, p. 2324-40, 2008.

EDALATI-FARD, F.; MIRGHAFOURVAND, M.; MOHAMMAD-ALIZADEH-CHARANDABI, S. *et al.* Relationship of Zinc and Magnesium Serum Levels with Postpartum Depression in Tabriz-Iran **Global Journal of Health Science**, v. 8, n. 11, p. 120-126, 2016.

EMERSON, R. O.; THOMAS, J. H. Adaptive evolution in zinc finger transcription factors. **PLoS Genet**, v. 5, n. 1, p. e1000325, 2009.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-51, 2000.

ERICKSON, K.; DREVETS, W.; SCHULKIN, J. Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 3, p. 233-46, 2003.

ESCARTIN, C.; WON, S. J.; MALGORN, C. *et al.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. **J Neurosci**, v. 31, n. 20, p. 7392-401, 2011.

FARAH, J. M., JR.; RAO, T. S.; MICK, S. J. *et al.* N-methyl-D-aspartate treatment increases circulating adrenocorticotropin and luteinizing hormone in the rat. **Endocrinology**, v. 128, n. 4, p. 1875-80, 1991.

FAROOQ, R. K.; ISINGRINI, E.; TANTI, A. *et al.* Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? **Behav Brain Res**, v. 231, n. 1, p. 130-7, 2012.

FATEMI, S. H.; ARAGHI-NIKNAM, M.; LAURENCE, J. A. *et al.* Glial fibrillary acidic protein and glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are increased in brains of neonatal BALB/c mice following viral infection in utero. **Schizophr Res**, v. 69, n. 1, p. 121-3, 2004.

FAVA, M. Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. **Biol Psychiatry**, v. 53, n. 8, p. 649-59, 2003.

FEYISSA, A. M.; CHANDRAN, A.; STOCKMEIER, C. A. *et al.* Reduced levels of NR2A and NR2B subunits of NMDA receptor and PSD-95 in the prefrontal cortex in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 1, p. 70-5, 2009.

FILHO, C. B.; JESSE, C. R.; DONATO, F. *et al.* Chronic unpredictable mild stress decreases BDNF and NGF levels and Na(+),K(+)-ATPase activity in the hippocampus and prefrontal cortex of mice: Antidepressant effect of chrysin. **Neuroscience**, v. 289, p. 367-80, 2015.

FLANDREAU, E. I.; RESSLER, K. J.; OWENS, M. J. *et al.* Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene-expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 1, p. 27-38, 2012.

FLINT, J.; KENDLER, K. S. The genetics of major depression. **Neuron**, v. 81, n. 3, p. 484-503, 2014.

FLUGGE, G. Dynamics of central nervous 5-HT_{1A}-receptors under psychosocial stress. **J Neurosci**, v. 15, n. 11, p. 7132-40, 1995.

FORESTI, M. L.; ARISI, G. M.; FERNANDES, A. *et al.* Chelatable zinc modulates excitability and seizure duration in the amygdala rapid kindling model. **Epilepsy Res**, v. 79, n. 2-3, p. 166-72, 2008.

FRANCO-PONS, N.; CASANOVAS-AGUILAR, C.; ARROYO, S. *et al.* Zinc-rich synaptic boutons in human temporal cortex biopsies. **Neuroscience**, v. 98, n. 3, p. 429-35, 2000.

FRANCO, J. L.; POSSER, T.; BROCARD, P. S. *et al.* Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect of zinc in rats. **Behav Brain Res**, v. 188, n. 2, p. 316-23, 2008.

FRASSINETTI, S.; BRONZETTI, G.; CALTAVUTURO, L. *et al.* The role of zinc in life: a review. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v. 25, n. 3, p. 597-610, 2006.

FREDERICKSON, C. J.; GIBLIN, L. J., 3RD; BALAJI, R. V. *et al.* Synaptic release of zinc from brain slices: factors governing release, imaging, and accurate calculation of concentration. **J Neurosci Methods**, v. 154, n. 1-2, p. 19-29, 2006.

FREDERICKSON, C. J.; KOH, J. Y.; BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 6, p. 449-62, 2005.

FREDERICKSON, C. J.; SUH, S. W.; SILVA, D. *et al.* Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. **J Nutr**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1471S-83S, 2000a.

FREDERICKSON, C. J.; SUH, S. W.; SILVA, D. *et al.* Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. **J Nutr**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1471S-83S, 2000b.

FREIS, E. D. Mental depression in hypertensive patients treated for long periods with large doses of reserpine. **N Engl J Med**, v. 251, n. 25, p. 1006-8, 1954.

FREITAS, A. E.; BETTIO, L. E.; NEIS, V. B. *et al.* Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 50, p. 143-50, 2014.

FREITAS, A. E.; EGEE, J.; BUENDIA, I. *et al.* Agmatine, by Improving Neuroplasticity Markers and Inducing Nrf2, Prevents Corticosterone-Induced Depressive-Like Behavior in Mice. **Mol Neurobiol**, 2015.

FRODL, T.; O'KEANE, V. How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. **Neurobiol Dis**, v. 52, p. 24-37, 2013.

FUCHS, E.; CZECH, B.; KOLE, M. H. *et al.* Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 14 Suppl 5, p. S481-90, 2004.

FUCHS, E.; FLUGGE, G. Chronic social stress: effects on limbic brain structures. **Physiol Behav**, v. 79, n. 3, p. 417-27, 2003.

GARAKANI, A.; MARTINEZ, J. M.; YEHUDA, R. *et al.* Cerebrospinal fluid levels of glutamate and corticotropin releasing hormone in major depression before and after treatment. **J Affect Disord**, v. 146, n. 2, p. 262-5, 2013.

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S. *et al.* Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 1, p. 140-4, 2008.

GARCIA, L. S.; COMIM, C. M.; VALVASSORI, S. S. *et al.* Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 450-5, 2009.

GEORGE, M. S.; KETTER, T. A.; POST, R. M. Prefrontal cortex dysfunction in clinical depression. **Depression**, v. 2 n. 2, p. 59–72, 1994.

GHASEMI, M.; KAZEMI, M. H.; YOOSEFI, A. *et al.* Rapid antidepressant effects of repeated doses of ketamine compared with electroconvulsive therapy in hospitalized patients with major depressive disorder. **Psychiatry Res**, v. 215, n. 2, p. 355-61, 2014.

GHASEMI, M.; MONTASER-KOUHSARI, L.; SHAFAROODI, H. *et al.* NMDA receptor/nitric system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 206, n. 2, p. 325-33, 2009.

GIELEN, M.; LE GOFF, A.; STROEBEL, D. *et al.* Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. **Neuron**, v. 57, n. 1, p. 80-93, 2008.

GILL, I.; DROUBI, S.; GIOVEDI, S. *et al.* Presynaptic NMDA receptors - dynamics and distribution in developing axons in vitro and in vivo. **J Cell Sci**, v. 128, n. 4, p. 768-80, 2015.

GILLESPIE, C. F.; NEMEROFF, C. B. Hypercortisolemia and depression. **Psychosom Med**, v. 67 Suppl 1, p. S26-8, 2005.

GONDA, X. Basic pharmacology of NMDA receptors. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 12, p. 1558-67, 2012.

GORSKI, J. A.; ZEILER, S. R.; TAMOWSKI, S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. **J Neurosci**, v. 23, n. 17, p. 6856-65, 2003.

GOSHEN, I.; KREISEL, T.; BEN-MENACHEM-ZIDON, O. *et al.* Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. **Mol Psychiatry**, v. 13, n. 7, p. 717-28, 2008.

GOULD, T. D.; EINAT, H.; BHAT, R. *et al.* AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 4, p. 387-90, 2004.

GOURLEY, S. L.; ESPITIA, J. W.; SANACORA, G. *et al.* Antidepressant-like properties of oral riluzole and utility of incentive disengagement models of depression in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 219, n. 3, p. 805-14, 2012.

GOURLEY, S. L.; WU, F. J.; KIRALY, D. D. *et al.* Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. **Biol Psychiatry**, v. 63, n. 4, p. 353-9, 2008.

GOWER-WINTER, S. D.; LEVENSON, C. W. Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior. **Biofactors**, v. 38, n. 3, p. 186-93, 2012.

GREENBERG, M. E.; XU, B.; LU, B. *et al.* New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. **J Neurosci**, v. 29, n. 41, p. 12764-7, 2009.

GRONLI, J.; BRAMHAM, C.; MURISON, R. *et al.* Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, n. 4, p. 842-9, 2006.

GROVES, J. O. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? **Mol Psychiatry**, v. 12, n. 12, p. 1079-88, 2007.

GUBELLINI, P.; PISANI, A.; CENTONZE, D. *et al.* Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. **Prog Neurobiol**, v. 74, n. 5, p. 271-300, 2004.

HAASE, H.; RINK, L. Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. **Annu Rev Nutr**, v. 29, p. 133-52, 2009.

HAASE, J.; BROWN, E. Integrating the monoamine, neurotrophin and cytokine hypotheses of depression—a central role for the serotonin transporter? **Pharmacol Ther**, v. 147, p. 1-11, 2015.

HAEFLEIN, K. A.; RASMUSSEN, A. I. Zinc content of selected foods. **J Am Diet Assoc**, v. 70, n. 6, p. 610-6, 1977.

HAMBIDGE, K. M. Zinc deficiency in man: its origins and effects. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 294, n. 1071, p. 129-44, 1981.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annu Rev Clin Psychol**, v. 1, p. 293-319, 2005.

- HAN, F.; SHIODA, N.; MORIGUCHI, S. *et al.* Spiro[imidazo[1,2-a]pyridine-3,2-indan]-2(3H)-one (ZSET1446/ST101) treatment rescues olfactory bulbectomy-induced memory impairment by activating Ca²⁺/calmodulin kinase II and protein kinase C in mouse hippocampus. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 326, n. 1, p. 127-34, 2008.
- HANCOCK, S. M.; FINKELSTEIN, D. I.; ADLARD, P. A. Glia and zinc in ageing and Alzheimer's disease: a mechanism for cognitive decline? **Front Aging Neurosci**, v. 6, p. 137, 2014.
- HARDINGHAM, G. E. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 6, p. 1147-60, 2009.
- HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1310-6, 2007.
- HASHIMOTO, K.; SHIMIZU, E.; IYO, M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. **Brain Res Rev**, v. 45, n. 2, p. 104-14, 2004.
- HASLER, G.; DREVETS, W. C.; MANJI, H. K. *et al.* Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1765-81, 2004.
- HASSAN, M. A.; ABDEL WAHAB, W. A.; ELSHAFIE, T. *et al.* Serum level of zinc and copper as predictors of severity of depression in chronic hemodialysis patients. **World Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 240-249, 2014.
- HAYES, J. D.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 4, p. 199-218, 2014.
- HE, M.; PAN, H.; CHANG, R. C. *et al.* Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84800, 2014.
- HEMPSTEAD, B. L. The many faces of p75^{NTR}. **Curr Opin Neurobiol**, v. 12, n. 3, p. 260-7, 2002.
- HERMAN, J. P.; OSTRANDER, M. M.; MUELLER, N. K. *et al.* Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1201-13, 2005.
- HERSHEY, C. O.; HERSHEY, L. A.; VARNES, A. *et al.* Cerebrospinal fluid trace element content in dementia: clinical, radiologic, and pathologic correlations. **Neurology**, v. 33, n. 10, p. 1350-3, 1983.

HIGASHI, Y.; SEGAWA, S.; MATSUO, T. *et al.* Microglial zinc uptake via zinc transporters induces ATP release and the activation of microglia. **Glia**, v. 59, n. 12, p. 1933-45, 2011.

HILLHOUSE, T. M.; PORTER, J. H. A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. **Exp Clin Psychopharmacol**, v. 23, n. 1, p. 1-21, 2015.

HINDMARCH, I. Expanding the horizons of depression: beyond the monoamine hypothesis. **Hum Psychopharmacol**, v. 16, n. 3, p. 203-218, 2001.

HOL, E. M.; PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Curr Opin Cell Biol**, v. 32, p. 121-30, 2015.

HOLMSETH, S.; DEHNES, Y.; HUANG, Y. H. *et al.* The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. **J Neurosci**, v. 32, n. 17, p. 6000-13, 2012.

HOLST, B.; HOLLIDAY, N. D.; BACH, A. *et al.* Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. **J Biol Chem**, v. 279, n. 51, p. 53806-17, 2004.

HOSANG, G. M.; SHILES, C.; TANSEY, K. E. *et al.* Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. **BMC Med**, v. 12, p. 7, 2014.

HOSHAW, B. A.; MALBERG, J. E.; LUCKI, I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. **Brain Res**, v. 1037, n. 1-2, p. 204-8, 2005.

HOWARD, A. D.; MCALLISTER, G.; FEIGHNER, S. D. *et al.* Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. **Trends Pharmacol Sci**, v. 22, n. 3, p. 132-40, 2001.

HUANG, Y. Z.; MCNAMARA, J. O. Mutual regulation of Src family kinases and the neurotrophin receptor TrkB. **J Biol Chem**, v. 285, n. 11, p. 8207-17, 2010.

HUANG, Y. Z.; PAN, E.; XIONG, Z. Q. *et al.* Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal synapse. **Neuron**, v. 57, n. 4, p. 546-58, 2008.

HUETHER, G.; DOERING, S.; RUGER, U. *et al.* The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiatry Res**, v. 87, n. 1, p. 83-95, 1999.

- HUETTNER, J. E. Kainate receptors and synaptic transmission. **Prog Neurobiol**, v. 70, n. 5, p. 387-407, 2003.
- HUGHES, E. G.; MAGUIRE, J. L.; MCMINN, M. T. *et al.* Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 124, n. 2, p. 114-23, 2004.
- HYND, M. R.; SCOTT, H. L.; DODD, P. R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochem Int**, v. 45, n. 5, p. 583-95, 2004.
- ILOUZ, R.; KAIDANOVICH, O.; GURWITZ, D. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by bivalent zinc ions: insight into the insulin-mimetic action of zinc. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 295, n. 1, p. 102-6, 2002.
- IMBE, H.; KIMURA, A.; DONISHI, T. *et al.* Chronic restraint stress decreases glial fibrillary acidic protein and glutamate transporter in the periaqueductal gray matter. **Neuroscience**, v. 223, p. 209-18, 2012.
- IRMISCH, G.; SCHLAEFKE, D.; RICHTER, J. Zinc and fatty acids in depression. **Neurochem Res**, v. 35, n. 9, p. 1376-83, 2010.
- IRWIN, S. A.; IGLEWICZ, A. Oral ketamine for the rapid treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care. **J Palliat Med**, v. 13, n. 7, p. 903-8, 2010.
- IRWIN, S. A.; IGLEWICZ, A.; NELESEN, R. A. *et al.* Daily oral ketamine for the treatment of depression and anxiety in patients receiving hospice care: a 28-day open-label proof-of-concept trial. **J Palliat Med**, v. 16, n. 8, p. 958-65, 2013.
- ISINGRINI, E.; CAMUS, V.; LE GUIQUET, A. M. *et al.* Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10404, 2010.
- JACKSON, V. R.; NOTHACKER, H. P.; CIVELLI, O. GPR39 receptor expression in the mouse brain. **Neuroreport**, v. 17, n. 8, p. 813-6, 2006.
- JANG, B. G.; WON, S. J.; KIM, J. H. *et al.* EAAC1 gene deletion alters zinc homeostasis and enhances cortical neuronal injury after transient cerebral ischemia in mice. **J Trace Elem Med Biol**, v. 26, n. 2-3, p. 85-8, 2012.
- JENSEN, A. A.; FAHLKE, C.; BJORN-YOSHIMOTO, W. E. *et al.* Excitatory amino acid transporters: recent insights into molecular mechanisms, novel modes of modulation and new therapeutic possibilities. **Curr Opin Pharmacol**, v. 20, p. 116-23, 2015.

JEZOVA, D.; OLIVER, C.; JURCOVICOVA, J. Stimulation of adrenocorticotropin but not prolactin and catecholamine release by N-methyl-aspartic acid. **Neuroendocrinology**, v. 54, n. 5, p. 488-92, 1991.

JIANG, J.; AMARA, S. G. New views of glutamate transporter structure and function: advances and challenges. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 1, p. 172-81, 2011.

JOELS, M.; DE KLOET, E. R. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. **Prog Neurobiol**, v. 43, n. 1, p. 1-36, 1994.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1911-2, 2002.

JOHNSON, J. A.; JOHNSON, D. A.; KRAFT, A. D. *et al.* The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1147, p. 61-9, 2008.

JOPE, R. S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 9, p. 441-3, 2003.

JOPE, R. S.; JOHNSON, G. V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 2, p. 95-102, 2004.

JOSHI, M.; AKHTAR, M.; NAJMI, A. K. *et al.* Effect of zinc in animal models of anxiety, depression and psychosis. **Hum Exp Toxicol**, v. 31, n. 12, p. 1237-43, 2012.

KAMBE, T.; TSUJI, T.; HASHIMOTO, A. *et al.* The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. **Physiol Rev**, v. 95, n. 3, p. 749-84, 2015.

KANAI, Y.; CLEMENCON, B.; SIMONIN, A. *et al.* The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 108-20, 2013.

KARAKAS, E.; REGAN, M. C.; FURUKAWA, H. Emerging structural insights into the function of ionotropic glutamate receptors. **Trends Biochem Sci**, v. 40, n. 6, p. 328-337, 2015.

KAREGE, F.; BONDOLFI, G.; GERVASONI, N. *et al.* Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 9, p. 1068-72, 2005a.

- KAREGE, F.; PERROUD, N.; BURKHARDT, S. *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, n. 2, p. 240-5, 2007.
- KAREGE, F.; VAUDAN, G.; SCHWALD, M. *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, n. 1-2, p. 29-37, 2005b.
- KASTER, M. P.; GADOTTI, V. M.; CALIXTO, J. B. *et al.* Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 419-26, 2012.
- KATON, W.; LIN, E. H.; KROENKE, K. The association of depression and anxiety with medical symptom burden in patients with chronic medical illness. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 29, n. 2, p. 147-55, 2007.
- KAUT, O.; SCHMITT, I.; HOFMANN, A. *et al.* Aberrant NMDA receptor DNA methylation detected by epigenome-wide analysis of hippocampus and prefrontal cortex in major depression. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 265, n. 4, p. 331-41, 2015.
- KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O. *et al.* The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095-105, 2003.
- KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O. *et al.* Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 593-602, 2005.
- KESSLER, R. C.; PETUKHOVA, M.; SAMPSON, N. A. *et al.* Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res**, v. 21, n. 3, p. 169-84, 2012.
- KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 1, p. 4-29, 2005.
- KIERAN, N.; OU, X. M.; IYO, A. H. Chronic social defeat downregulates the 5-HT1A receptor but not Freud-1 or NUDR in the rat prefrontal cortex. **Neurosci Lett**, v. 469, n. 3, p. 380-4, 2010.
- KIKUCHI, G.; YOSHIDA, T.; NOGUCHI, M. Heme oxygenase and heme degradation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 338, n. 1, p. 558-67, 2005.
- KIM, W. K.; SHIN, D.; SONG, W. O. Depression and Its Comorbid Conditions More Serious in Women than in Men in the United States. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 24, n. 12, p. 978-85, 2015.

KIM, Y. H.; KIM, E. Y.; GWAG, B. J. *et al.* Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. **Neuroscience**, v. 89, n. 1, p. 175-82, 1999.

KING, J. C. Zinc: an essential but elusive nutrient. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 2, p. 679S-84S, 2011.

KING, J. C.; SHAMES, D. M.; WOODHOUSE, L. R. Zinc homeostasis in humans. **J Nutr**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1360S-6S, 2000.

KIRSCH, I.; DEACON, B. J.; HUEDO-MEDINA, T. B. *et al.* Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. **PLoS Med**, v. 5, n. 2, p. e45, 2008.

KOMATSU, K.; KIKUCHI, K.; KOJIMA, H. *et al.* Selective zinc sensor molecules with various affinities for Zn²⁺, revealing dynamics and regional distribution of synaptically released Zn²⁺ in hippocampal slices. **J Am Chem Soc**, v. 127, n. 29, p. 10197-204, 2005.

KOPONEN, E.; RANTAMAKI, T.; VOIKAR, V. *et al.* Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines. **Cell Mol Neurobiol**, v. 25, n. 6, p. 973-80, 2005.

KORMOSH, N.; LAKTIONOV, K.; ANTOSHECHKINA, M. Effect of a combination of extract from several plants on cell-mediated and humoral immunity of patients with advanced ovarian cancer. **Phytother Res**, v. 20, n. 5, p. 424-5, 2006.

KRAKOWSKI, A. J. Treatment of depression with imipramine (Tofranil) and imipramine combined with promazine. **J New Drugs**, v. 2, p. 56-62, 1962.

KRINGELBACH, M. L. The human orbitofrontal cortex: linking reward to hedonic experience. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 9, p. 691-702, 2005.

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

KRIZMAN-GENDA, E.; GONZALEZ, M. I.; ZELENIAIA, O. *et al.* Evidence that Akt mediates platelet-derived growth factor-dependent increases in activity and surface expression of the neuronal glutamate transporter, EAAC1. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 6, p. 872-82, 2005.

KROCZKA, B.; BRANSKI, P.; PALUCHA, A. *et al.* Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test. **Brain Res Bull**, v. 55, n. 2, p. 297-300, 2001.

- KROCZKA, B.; ZIEBA, A.; DUDEK, D. *et al.* Zinc exhibits an antidepressant-like effect in the forced swimming test in mice. **Pol J Pharmacol**, v. 52, n. 5, p. 403-6, 2000.
- KUCUKIBRAHIMOGLU, E.; SAYGIN, M. Z.; CALISKAN, M. *et al.* The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 571-7, 2009.
- KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 214, n. 4, p. 819-28, 2011.
- KYROU, I.; TSIGOS, C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, n. 6, p. 787-93, 2009.
- LAI, J.; MOXEY, A.; NOWAK, G. *et al.* The efficacy of zinc supplementation in depression: systematic review of randomised controlled trials. **J Affect Disord**, v. 136, n. 1-2, p. e31-9, 2012.
- LAMERS, F.; VOGELZANGS, N.; MERIKANGAS, K. R. *et al.* Evidence for a differential role of HPA-axis function, inflammation and metabolic syndrome in melancholic versus atypical depression. **Mol Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 692-9, 2013.
- LANG, U. E.; BEGLINGER, C.; SCHWEINFURTH, N. *et al.* Nutritional aspects of depression. **Cell Physiol Biochem**, v. 37, n. 3, p. 1029-43, 2015.
- LAPIDUS, K. A.; LEVITCH, C. F.; PEREZ, A. M. *et al.* A randomized controlled trial of intranasal ketamine in major depressive disorder. **Biol Psychiatry**, v. 76, n. 12, p. 970-6, 2014.
- LARA, D. R.; BISOL, L. W.; MUNARI, L. R. Antidepressant, mood stabilizing and procognitive effects of very low dose sublingual ketamine in refractory unipolar and bipolar depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 9, p. 2111-7, 2013.
- LARSEN, M. H.; MIKKELSEN, J. D.; HAY-SCHMIDT, A. *et al.* Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. **J Psychiatr Res**, v. 44, n. 13, p. 808-16, 2010.
- LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch**, v. 460, n. 2, p. 525-42, 2010.
- LEE, B. H.; KIM, H.; PARK, S. H. *et al.* Decreased plasma BDNF level in depressive patients. **J Affect Disord**, v. 101, n. 1-3, p. 239-44, 2007.

LEE, B. H.; KIM, Y. K. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. **Psychiatry Investig**, v. 7, n. 4, p. 231-5, 2010.

LEE, J. M.; ZIPFEL, G. J.; PARK, K. H. *et al.* Zinc translocation accelerates infarction after mild transient focal ischemia. **Neuroscience**, v. 115, n. 3, p. 871-8, 2002.

LEE, S.; CHANOIT, G.; MCINTOSH, R. *et al.* Molecular mechanism underlying Akt activation in zinc-induced cardioprotection. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 2, p. H569-75, 2009.

LEE, S. Y.; LEE, S. J.; HAN, C. *et al.* Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 46, p. 224-35, 2013.

LEHTO, S. M.; RUUSUNEN, A.; TOLMUNEN, T. *et al.* Dietary zinc intake and the risk of depression in middle-aged men: a 20-year prospective follow-up study. **J Affect Disord**, v. 150, n. 2, p. 682-5, 2013.

LENGYEL, I.; FIEUW-MAKAROFF, S.; HALL, A. L. *et al.* Modulation of the phosphorylation and activity of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by zinc. **J Neurochem**, v. 75, n. 2, p. 594-605, 2000.

LENZE, E. J.; SKIDMORE, E. R.; BEGLEY, A. E. *et al.* Memantine for late-life depression and apathy after a disabling medical event: a 12-week, double-blind placebo-controlled pilot study. **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 27, n. 9, p. 974-80, 2012.

LEONARD, B. E. Impact of inflammation on neurotransmitter changes in major depression: an insight into the action of antidepressants. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 48, p. 261-7, 2014.

LEPINE, J. P.; BRILEY, M. The increasing burden of depression. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 7, n. Suppl 1, p. 3-7, 2011.

LESSMANN, V.; GOTTMANN, K.; MALCANGIO, M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 5, p. 341-74, 2003.

LEVINE, J.; PANCHALINGAM, K.; RAPOPORT, A. *et al.* Increased cerebrospinal fluid glutamine levels in depressed patients. **Biol Psychiatry**, v. 47, n. 7, p. 586-93, 2000.

LEVY, L. M.; LEHRE, K. P.; ROLSTAD, B. *et al.* A monoclonal antibody raised against an [Na(+)+K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. **FEBS Lett**, v. 317, n. 1-2, p. 79-84, 1993.

- LEWERENZ, J.; HEWETT, S. J.; HUANG, Y. *et al.* The cystine/glutamate antiporter system x(c⁻) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 5, p. 522-55, 2013.
- LI, K. W.; CHEN, N.; SMIT, A. B. Interaction proteomics of the AMPA receptor: towards identification of receptor sub-complexes. **Amino Acids**, v. 44, n. 5, p. 1247-51, 2013.
- LI, L. B.; TOAN, S. V.; ZELENIAIA, O. *et al.* Regulation of astrocytic glutamate transporter expression by Akt: evidence for a selective transcriptional effect on the GLT-1/EAAT2 subtype. **J Neurochem**, v. 97, n. 3, p. 759-71, 2006.
- LI, N.; LEE, B.; LIU, R. J. *et al.* mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959-64, 2010.
- LI, N.; LIU, R. J.; DWYER, J. M. *et al.* Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754-61, 2011.
- LI, X.; ZHU, W.; ROH, M. S. *et al.* In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 8, p. 1426-31, 2004.
- LI, Y.; LUIKART, B. W.; BIRNBAUM, S. *et al.* TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. **Neuron**, v. 59, n. 3, p. 399-412, 2008.
- LIANG, D.; YANG, M.; GUO, B. *et al.* Zinc inhibits H(2)O(2)-induced MC3T3-E1 cells apoptosis via MAPK and PI3K/AKT pathways. **Biol Trace Elem Res**, v. 148, n. 3, p. 420-9, 2012.
- LIN, D. D.; COHEN, A. S.; COULTER, D. A. Zinc-induced augmentation of excitatory synaptic currents and glutamate receptor responses in hippocampal CA3 neurons. **J Neurophysiol**, v. 85, n. 3, p. 1185-96, 2001.
- LINDHOLM, J. S.; CASTREN, E. Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 143, 2014.
- LITTLE, K. Y.; CASTELLANOS, X.; HUMPHRIES, L. L. *et al.* Altered zinc metabolism in mood disorder patients. **Biol Psychiatry**, v. 26, n. 6, p. 646-8, 1989.
- LIU, D.; XIE, K.; YANG, X. *et al.* Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. **Behav Brain Res**, v. 264, p. 9-16, 2014.

LIU, J. H.; WU, Z. F.; SUN, J. *et al.* Role of AC-cAMP-PKA Cascade in Antidepressant Action of Electroacupuncture Treatment in Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 932414, 2012.

LIU, Q.; LI, B.; ZHU, H. Y. *et al.* Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 11, p. 796-805, 2009.

_____. Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment. **J Affect Disord**, v. 128, n. 3, p. 309-13, 2011.

LIU, T.; ZHONG, S.; LIAO, X. *et al.* A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0138904, 2015.

LIUZZI, J. P.; COUSINS, R. J. Mammalian zinc transporters. **Annu Rev Nutr**, v. 24, p. 151-72, 2004.

LOBATO, K. R.; BINFARE, R. W.; BUDNI, J. *et al.* Involvement of the adenosine A1 and A2A receptors in the antidepressant-like effect of zinc in the forced swimming test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. 994-9, 2008.

LONNERDAL, B. Dietary factors influencing zinc absorption. **J Nutr**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1378S-83S, 2000.

LOPANTSEV, V.; WENZEL, H. J.; COLE, T. B. *et al.* Lack of vesicular zinc in mossy fibers does not affect synaptic excitability of CA3 pyramidal cells in zinc transporter 3 knockout mice. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 237-48, 2003.

LU, D. Y.; TSAO, Y. Y.; LEUNG, Y. M. *et al.* Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: implications of antidepressant effects for omega-3 fatty acids. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 11, p. 2238-48, 2010.

LU, X. R.; ONG, W. Y. Heme oxygenase-1 is expressed in viable astrocytes and microglia but in degenerating pyramidal neurons in the kainate-lesioned rat hippocampus. **Exp Brain Res**, v. 137, n. 3-4, p. 424-31, 2001.

LU, X. Y.; KIM, C. S.; FRAZER, A. *et al.* Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1593-8, 2006.

LUSSIER, A. L.; LEBEDEVA, K.; FENTON, E. Y. *et al.* The progressive development of depression-like behavior in corticosterone-treated rats is paralleled by slowed granule cell maturation and decreased reelin expression in the adult dentate gyrus. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 174-83, 2013.

MACPHERSON, A.; DINKEL, K.; SAPOLSKY, R. Glucocorticoids worsen excitotoxin-induced expression of pro-inflammatory cytokines in hippocampal cultures. **Exp Neurol**, v. 194, n. 2, p. 376-83, 2005.

MACQUEEN, G.; FRODL, T. The hippocampus in major depression: evidence for the convergence of the bench and bedside in psychiatric research? **Mol Psychiatry**, v. 16, n. 3, p. 252-64, 2011.

MAES, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 29, n. 3, p. 287-91, 2008.

MAES, M.; D'HAESE, P. C.; SCHARPE, S. *et al.* Hypozincemia in depression. **J Affect Disord**, v. 31, n. 2, p. 135-40, 1994.

MAES, M.; DE VOS, N.; DEMEDTS, P. *et al.* Lower serum zinc in major depression in relation to changes in serum acute phase proteins. **J Affect Disord**, v. 56, n. 2-3, p. 189-94, 1999.

MAES, M.; FISAR, Z.; MEDINA, M. *et al.* New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates--Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 3, p. 127-50, 2012.

MAES, M.; VANDOOOLAEGHE, E.; NEELS, H. *et al.* Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in that illness. **Biol Psychiatry**, v. 42, n. 5, p. 349-58, 1997.

MAES, M.; VERKERK, R.; VANDOOOLAEGHE, E. *et al.* Serum levels of excitatory amino acids, serine, glycine, histidine, threonine, taurine, alanine and arginine in treatment-resistant depression: modulation by treatment with antidepressants and prediction of clinical responsiveness. **Acta Psychiatr Scand**, v. 97, n. 4, p. 302-8, 1998.

MAGISTRETTI, J.; CASTELLI, L.; TAGLIETTI, V. *et al.* Dual effect of Zn²⁺ on multiple types of voltage-dependent Ca²⁺ currents in rat palaeocortical neurons. **Neuroscience**, v. 117, n. 2, p. 249-64, 2003.

MAINES, M. D.; TRAKSHEL, G. M.; KUTTY, R. K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. **J Biol Chem**, v. 261, n. 1, p. 411-9, 1986.

MAKINO, S.; HASHIMOTO, K.; GOLD, P. W. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 73, n. 1, p. 147-58, 2002.

MALAIYANDI, L. M.; DINELEY, K. E.; REYNOLDS, I. J. Divergent consequences arise from metallothionein overexpression in astrocytes: zinc buffering and oxidant-induced zinc release. **Glia**, v. 45, n. 4, p. 346-53, 2004.

MALBERG, J. E. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 3, p. 196-205, 2004.

MALBERG, J. E.; BLENDY, J. A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 12, p. 631-8, 2005.

MALETIC, V.; ROBINSON, M.; OAKES, T. *et al.* Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. **Int J Clin Pract**, v. 61, n. 12, p. 2030-40, 2007.

MANN, J. J.; HUANG, Y. Y.; UNDERWOOD, M. D. *et al.* A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 8, p. 729-38, 2000.

MANOSSO, L. M.; MORETTI, M.; RODRIGUES, A. L. Nutritional strategies for dealing with depression. **Food Funct**, v. 4, n. 12, p. 1776-93, 2013.

MARGER, L.; SCHUBERT, C. R.; BERTRAND, D. Zinc: an underappreciated modulatory factor of brain function. **Biochem Pharmacol**, v. 91, n. 4, p. 426-35, 2014.

MARSDEN, W. N. Synaptic plasticity in depression: molecular, cellular and functional correlates. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 43, p. 168-84, 2013.

MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D.; BUDNI, J.; CUNHA, M. P. *et al.* Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 2010-22, 2013.

MASEREJIAN, N. N.; HALL, S. A.; MCKINLAY, J. B. Low dietary or supplemental zinc is associated with depression symptoms among women, but not men, in a population-based epidemiological survey. **J Affect Disord**, v. 136, n. 3, p. 781-8, 2012.

MATHEWS, D. C.; HENTER, I. D.; ZARATE, C. A. Targeting the glutamatergic system to treat major depressive disorder: rationale and progress to date. **Drugs**, v. 72, n. 10, p. 1313-33, 2012.

MAURI, M. C.; FERRARA, A.; BOSCATI, L. *et al.* Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiology**, v. 37, n. 3, p. 124-9, 1998.

- MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, n. 3, p. 436-52, 2006.
- MCCALL, K. A.; HUANG, C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **J Nutr**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1437S-46S, 2000.
- MCEWEN, B. S. 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, n. 2-3, p. 174-85, 2008.
- MCGONAGLE, K. A.; KESSLER, R. C. Chronic stress, acute stress, and depressive symptoms. **Am J Community Psychol**, v. 18, n. 5, p. 681-706, 1990.
- MCLOUGHLIN, I. J.; HODGE, J. S. Zinc in depressive disorder. **Acta Psychiatr Scand**, v. 82, n. 6, p. 451-3, 1990.
- MCNULTY, J. P.; HAHN, K. Compounded oral ketamine. **Int J Pharm Compd**, v. 16, n. 5, p. 364-8, 2012.
- MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P. *et al.* Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **Eur J Pharmacol**, v. 698, n. 1-3, p. 6-18, 2013.
- MELLSTROM, B.; TORRES, B.; LINK, W. A. *et al.* The BDNF gene: exemplifying complexity in Ca²⁺-dependent gene expression. **Crit Rev Neurobiol**, v. 16, n. 1-2, p. 43-9, 2004.
- MENDEZ-DAVID, I.; TRITSCHLER, L.; ALI, Z. E. *et al.* Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression. **Neurosci Lett**, v. 597, p. 121-6, 2015.
- MENG, X. B.; SUN, G. B.; WANG, M. *et al.* P90RSK and Nrf2 Activation via MEK1/2-ERK1/2 Pathways Mediated by Notoginsenoside R2 to Prevent 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptotic Death in SH-SY5Y Cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 971712, 2013.
- MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. GFAP in health and disease. **Prog Neurobiol**, v. 93, n. 3, p. 421-43, 2011.
- MIGUEL-HIDALGO, J. J.; WALTZER, R.; WHITTON, A. A. *et al.* Glial and glutamatergic markers in depression, alcoholism, and their comorbidity. **J Affect Disord**, v. 127, n. 1-3, p. 230-40, 2010.
- MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732-41, 2009.

MILLER, E. K.; COHEN, J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 167-202, 2001.

MITROVIC, A. D.; PLESKO, F.; VANDENBERG, R. J. Zn(2+) inhibits the anion conductance of the glutamate transporter EEAT4. **J Biol Chem**, v. 276, n. 28, p. 26071-6, 2001.

MLYNIEC, K.; BUDZISZEWSKA, B.; HOLST, B. *et al.* GPR39 (zinc receptor) knockout mice exhibit depression-like behavior and CREB/BDNF down-regulation in the hippocampus. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 3, 2015a.

MLYNIEC, K.; BUDZISZEWSKA, B.; RECYNSKI, W. *et al.* Zinc deficiency alters responsiveness to antidepressant drugs in mice. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 3, p. 579-92, 2013a.

MLYNIEC, K.; BUDZISZEWSKA, B.; RECYNSKI, W. *et al.* The role of the GPR39 receptor in zinc deficient-animal model of depression. **Behav Brain Res**, v. 238, p. 30-5, 2013b.

MLYNIEC, K.; DOBOSZEWSKA, U.; SZEWCZYK, B. *et al.* The involvement of the GPR39-Zn(2+)-sensing receptor in the pathophysiology of depression. Studies in rodent models and suicide victims. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 290-7, 2014.

MLYNIEC, K.; GAWEL, M.; NOWAK, G. Study of antidepressant drugs in GPR39 (zinc receptor(-)/(-)) knockout mice, showing no effect of conventional antidepressants, but effectiveness of NMDA antagonists. **Behav Brain Res**, v. 287, p. 135-8, 2015.

MLYNIEC, K.; NOWAK, G. Zinc deficiency induces behavioral alterations in the tail suspension test in mice. Effect of antidepressants. **Pharmacol Rep**, v. 64, n. 2, p. 249-55, 2012.

_____. GPR39 up-regulation after selective antidepressants. **Neurochem Int**, v. 62, n. 7, p. 936-9, 2013.

_____. Up-regulation of the GPR39 Zn²⁺-sensing receptor and CREB/BDNF/TrkB pathway after chronic but not acute antidepressant treatment in the frontal cortex of zinc-deficient mice. **Pharmacol Rep**, v. 67, n. 6, p. 1135-40, 2015.

MLYNIEC, K.; SINGEWALD, N.; HOLST, B. *et al.* GPR39 Zn(2+)-sensing receptor: a new target in antidepressant development? **J Affect Disord**, v. 174, p. 89-100, 2015b.

MLYNIEC, K.; TROJAN, E.; SLUSARCZYK, J. *et al.* Immune malfunction in the GPR39 zinc receptor of knockout mice: Its relationship to depressive disorder. **J Neuroimmunol**, v. 291, p. 11-7, 2016.

MO, L.; YANG, C.; GU, M. *et al.* PI3K/Akt signaling pathway-induced heme oxygenase-1 upregulation mediates the adaptive cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against oxidative injury in PC12 cells. **Int J Mol Med**, v. 30, n. 2, p. 314-20, 2012.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; BUDNI, J. *et al.* Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3beta pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 9, p. 1400-8, 2011.

MOLZ, S.; DECKER, H.; DAL-CIM, T. *et al.* Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. **Neurochem Res**, v. 33, n. 1, p. 27-36, 2008.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; FREITAS, A. E. *et al.* TNF-alpha-induced depressive-like phenotype and p38(MAPK) activation are abolished by ascorbic acid treatment. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, n. 6, p. 902-12, 2015.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; FREITAS, A. E. *et al.* Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res**, v. 48, n. 1, p. 16-24, 2013.

_____. Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res**, v. 48, n. 1, p. 16-24, 2014.

MORETTI, M.; COLLA, A.; DE OLIVEIRA BALEN, G. *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, n. 3, p. 331-40, 2012.

MORIGUCHI, S.; HAN, F.; NAKAGAWASAI, O. *et al.* Decreased calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C activities mediate impairment of hippocampal long-term potentiation in the olfactory bulbectomized mice. **J Neurochem**, v. 97, n. 1, p. 22-9, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUSAVI, S. A.; HABIBBOLLAHI, H.; MAHMOUDIAN, F. Low serum zinc level in depression.

. **J. Res. Med. Sci.** , v. 11, n. 3, p. 190–192, 2006.

MOYLAN, S.; BERK, M.; DEAN, O. M. *et al.* Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 45, p. 46-62, 2014.

MUNHOZ, C. D.; LEPSCH, L. B.; KAWAMOTO, E. M. *et al.* Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. **J Neurosci**, v. 26, n. 14, p. 3813-20, 2006.

MUNHOZ, T. N.; NUNES, B. P.; WEHRMEISTER, F. C. *et al.* A nationwide population-based study of depression in Brazil. **J Affect Disord**, v. 192, p. 226-33, 2016.

MUNOZ, A. M.; REY, P.; PARGA, J. *et al.* Glial overexpression of heme oxygenase-1: a histochemical marker for early stages of striatal damage. **J Chem Neuroanat**, v. 29, n. 2, p. 113-26, 2005.

MURAKAMI, S.; IMBE, H.; MORIKAWA, Y. *et al.* Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. **Neurosci Res**, v. 53, n. 2, p. 129-39, 2005.

MURPHY, E. W.; WILLIS, B. W.; WATT, B. K. Provisional tables on the zinc content of foods. **J Am Diet Assoc**, v. 66, n. 4, p. 345-55, 1975.

MURRAY, F.; SMITH, D. W.; HUTSON, P. H. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 1, p. 115-27, 2008.

MURROUGH, J. W.; IOSIFESCU, D. V.; CHANG, L. C. *et al.* Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. **Am J Psychiatry**, v. 170, n. 10, p. 1134-42, 2013a.

MURROUGH, J. W.; PEREZ, A. M.; PILLEMER, S. *et al.* Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. **Biol Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 250-6, 2013b.

MUSHOLT, K.; CIRILLO, G.; CAVALIERE, C. *et al.* Neonatal separation stress reduces glial fibrillary acidic protein- and S100beta-immunoreactive astrocytes in the rat medial precentral cortex. **Dev Neurobiol**, v. 69, n. 4, p. 203-11, 2009.

NAIR, A.; VAIDYA, V. A. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? **J Biosci**, v. 31, n. 3, p. 423-34, 2006.

NAKASO, K.; YANO, H.; FUKUHARA, Y. *et al.* PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. **FEBS Lett**, v. 546, n. 2-3, p. 181-4, 2003.

NARANG, R. L.; GUPTA, K. R.; NARANG, A. P. *et al.* Levels of copper and zinc in depression. **Indian J Physiol Pharmacol**, v. 35, n. 4, p. 272-4, 1991.

NAUDET, F.; MARIA, A. S.; FALISSARD, B. Antidepressant response in major depressive disorder: a meta-regression comparison of randomized controlled trials and observational studies. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20811, 2011.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res**, v. 41, n. 3-4, p. 189-206, 2007.

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1068-70, 2002.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J. *et al.* Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 10, p. 1161-9, 2010.

NICIU, M. J.; IONESCU, D. F.; MATHEWS, D. C. *et al.* Second messenger/signal transduction pathways in major mood disorders: moving from membrane to mechanism of action, part I: major depressive disorder. **CNS Spectr**, v. 18, n. 5, p. 231-41, 2013.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 656-64, 2012.

NIEOULLON, A.; CANOLLE, B.; MASMEJEAN, F. *et al.* The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? **J Neurochem**, v. 98, n. 4, p. 1007-18, 2006.

NITURE, S. K.; KHATRI, R.; JAISWAL, A. K. Regulation of Nrf2-an update. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 36-44, 2014.

NOLTE, C.; GORE, A.; SEKLER, I. *et al.* ZnT-1 expression in astroglial cells protects against zinc toxicity and slows the accumulation of intracellular zinc. **Glia**, v. 48, n. 2, p. 145-55, 2004.

NOWAK, G. Zinc, future mono/adjunctive therapy for depression: Mechanisms of antidepressant action. **Pharmacol Rep**, v. 67, n. 3, p. 659-62, 2015.

NOWAK, G.; LEGUTKO, B.; SZEWCZYK, B. *et al.* Zinc treatment induces cortical brain-derived neurotrophic factor gene expression. **Eur J Pharmacol**, v. 492, n. 1, p. 57-9, 2004.

NOWAK, G.; SIWEK, M.; DUDEK, D. *et al.* Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study. **Pol J Pharmacol**, v. 55, n. 6, p. 1143-7, 2003a.

NOWAK, G.; SZEWCZYK, B. Mechanisms contributing to antidepressant zinc actions. **Pol J Pharmacol**, v. 54, n. 6, p. 587-92, 2002.

NOWAK, G.; SZEWCZYK, B.; PILC, A. Zinc and depression. An update. **Pharmacol Rep**, v. 57, n. 6, p. 713-8, 2005.

NOWAK, G.; SZEWCZYK, B.; WIERONSKA, J. M. *et al.* Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats. **Brain Res Bull**, v. 61, n. 2, p. 159-64, 2003b.

NUMAKAWA, T.; SUZUKI, S.; KUMAMARU, E. *et al.* BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histol Histopathol**, v. 25, n. 2, p. 237-58, 2010.

NUTTALL, J. R.; OTEIZA, P. I. Zinc and the ERK kinases in the developing brain. **Neurotox Res**, v. 21, n. 1, p. 128-41, 2012.

O'DELL, B. L. History and status of zinc in nutrition. Introduction. **Fed Proc**, v. 43, n. 13, p. 2821-2, 1984.

OLIVEIRA, C. S.; RIGON, A. P.; LEAL, R. B. *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, n. 3-4, p. 355-62, 2008.

OMATA, Y.; SALVADOR, G. A.; SUPASAI, S. *et al.* Decreased zinc availability affects glutathione metabolism in neuronal cells and in the developing brain. **Toxicol Sci**, v. 133, n. 1, p. 90-100, 2013.

ORTINSKI, P. I.; DONG, J.; MUNGENAST, A. *et al.* Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 5, p. 584-91, 2010.

OTTE, C.; MARMAR, C. R.; PIPKIN, S. S. *et al.* Depression and 24-hour urinary cortisol in medical outpatients with coronary heart disease: The Heart and Soul Study. **Biol Psychiatry**, v. 56, n. 4, p. 241-7, 2004.

PANDEY, G. N.; DWIVEDI, Y.; PANDEY, S. C. *et al.* Protein kinase C in the postmortem brain of teenage suicide victims. **Neurosci Lett**, v. 228, n. 2, p. 111-4, 1997.

- PANDEY, G. N.; DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H. S. *et al.* Decreased catalytic activity and expression of protein kinase C isozymes in teenage suicide victims: a postmortem brain study. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. 7, p. 685-93, 2004.
- PANDEY, G. N.; DWIVEDI, Y.; RIZAVI, H. S. *et al.* GSK-3beta gene expression in human postmortem brain: regional distribution, effects of age and suicide. **Neurochem Res**, v. 34, n. 2, p. 274-85, 2009.
- PANDEY, G. N.; REN, X.; RIZAVI, H. S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase B receptor signalling in post-mortem brain of teenage suicide victims. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 8, p. 1047-61, 2008.
- PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 383-400, 2013.
- PAOLETTI, P.; VERGNANO, A. M.; BARBOUR, B. *et al.* Zinc at glutamatergic synapses. **Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 126-36, 2009.
- PARFENOVA, H.; BASUROY, S.; BHATTACHARYA, S. *et al.* Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 290, n. 5, p. C1399-410, 2006.
- PARIANTE, C. M.; LIGHTMAN, S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 9, p. 464-8, 2008.
- PARK, K. S.; AHN, Y.; KIM, J. A. *et al.* Extracellular zinc stimulates ERK-dependent activation of p21(Cip/WAF1) and inhibits proliferation of colorectal cancer cells. **Br J Pharmacol**, v. 137, n. 5, p. 597-607, 2002.
- PARKIN, G. Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. **Chem Rev**, v. 104, n. 2, p. 699-767, 2004.
- PEPERSACK, T.; ROTSAERT, P.; BENOIT, F. *et al.* Prevalence of zinc deficiency and its clinical relevance among hospitalised elderly. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 33, n. 3, p. 243-53, 2001.
- PESELOW, E. D.; TOBIA, G.; KARAMIANS, R. *et al.* Prophylactic efficacy of fluoxetine, escitalopram, sertraline, paroxetine, and concomitant psychotherapy in major depressive disorder: outcome after long-term follow-up. **Psychiatry Res**, v. 225, n. 3, p. 680-6, 2015.
- PETERS, S.; KOH, J.; CHOI, D. W. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. **Science**, v. 236, n. 4801, p. 589-93, 1987.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83, n. 2, p. 346-56, 1977.

PETKOVIC, V.; MILETTA, M. C.; MULLIS, P. E. From endoplasmic reticulum to secretory granules: role of zinc in the secretory pathway of growth hormone. **Endocr Dev**, v. 23, p. 96-108, 2012.

PIWOWARSKA, J.; CHIMIAK, A.; MATSUMOTO, H. *et al.* Serum cortisol concentration in patients with major depression after treatment with fluoxetine. **Psychiatry Res**, v. 198, n. 3, p. 407-11, 2012.

POCHWAT, B.; SZEWCZYK, B.; SOWA-KUCMA, M. *et al.* Antidepressant-like activity of magnesium in the chronic mild stress model in rats: alterations in the NMDA receptor subunits. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 17, n. 3, p. 393-405, 2014.

POLESZAK, E.; SZEWCZYK, B.; WLAZ, A. *et al.* D-serine, a selective glycine/N-methyl-D-aspartate receptor agonist, antagonizes the antidepressant-like effects of magnesium and zinc in mice. **Pharmacol Rep**, v. 60, n. 6, p. 996-1000, 2008.

POLESZAK, E.; WLAZ, P.; KEDZIERSKA, E. *et al.* Immobility stress induces depression-like behavior in the forced swim test in mice: effect of magnesium and imipramine. **Pharmacol Rep**, v. 58, n. 5, p. 746-52, 2006.

POMIERNY-CHAMIOLO, L.; RUP, K.; POMIERNY, B. *et al.* Metabotropic glutamatergic receptors and their ligands in drug addiction. **Pharmacol Ther**, v. 142, n. 3, p. 281-305, 2014.

POPOLI, M.; BRUNELLO, N.; PEREZ, J. *et al.* Second messenger-regulated protein kinases in the brain: their functional role and the action of antidepressant drugs. **J Neurochem**, v. 74, n. 1, p. 21-33, 2000.

POPOLI, M.; YAN, Z.; MCEWEN, B. S. *et al.* The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22-37, 2012.

POPOVICS, P.; STEWART, A. J. GPR39: a Zn(2+)-activated G protein-coupled receptor that regulates pancreatic, gastrointestinal and neuronal functions. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 1, p. 85-95, 2011.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.

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

PRASAD, A. S. Discovery and importance of zinc in human nutrition. **Fed Proc**, v. 43, n. 13, p. 2829-34, 1984.

_____. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. **Exp Gerontol**, v. 43, n. 5, p. 370-7, 2008.

_____. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. **J Trace Elem Med Biol**, v. 26, n. 2-3, p. 66-9, 2012.

_____. Zinc: an antioxidant and anti-inflammatory agent: role of zinc in degenerative disorders of aging. **J Trace Elem Med Biol**, v. 28, n. 4, p. 364-71, 2014.

PRASAD, A. S.; BAO, B.; BECK, F. W. *et al.* Antioxidant effect of zinc in humans. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 8, p. 1182-90, 2004.

PRASAD, A. S.; HALSTED, J. A.; NADIMI, M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. **Am J Med**, v. 31, p. 532-46, 1961.

PRESKORN, S. H.; BAKER, B.; KOLLURI, S. *et al.* An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. **J Clin Psychopharmacol**, v. 28, n. 6, p. 631-7, 2008.

QI, D.; OUYANG, C.; WANG, Y. *et al.* HO-1 attenuates hippocampal neurons injury via the activation of BDNF-TrkB-PI3K/Akt signaling pathway in stroke. **Brain Res**, v. 1577, p. 69-76, 2014.

QI, X.; LIN, W.; LI, J. *et al.* Fluoxetine increases the activity of the ERK-CREB signal system and alleviates the depressive-like behavior in rats exposed to chronic forced swim stress. **Neurobiol Dis**, v. 31, n. 2, p. 278-85, 2008.

QIAN, J.; NOEBELS, J. L. Visualization of transmitter release with zinc fluorescence detection at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. **J Physiol**, v. 566, n. Pt 3, p. 747-58, 2005.

RAISON, C. L.; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol**, v. 27, n. 1, p. 24-31, 2006.

RAJKOWSKA, G.; MIGUEL-HIDALGO, J. J. Gliogenesis and glial pathology in depression. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 6, n. 3, p. 219-33, 2007.

RANJBAR, E.; KASAEI, M. S.; MOHAMMAD-SHIRAZI, M. *et al.* Effects of zinc supplementation in patients with major depression: a randomized clinical trial. **Iran J Psychiatry**, v. 8, n. 2, p. 73-9, 2013.

RANJBAR, E.; SHAMS, J.; SABETKASAEI, M. *et al.* Effects of zinc supplementation on efficacy of antidepressant therapy, inflammatory cytokines, and brain-derived neurotrophic factor in patients with major depression. **Nutr Neurosci**, v. 17, n. 2, p. 65-71, 2014.

RASSENDREN, F. A.; LORY, P.; PIN, J. P. *et al.* Zinc has opposite effects on NMDA and non-NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Neuron**, v. 4, n. 5, p. 733-40, 1990.

RAUDENSKY, J.; YAMAMOTO, B. K. Effects of chronic unpredictable stress and methamphetamine on hippocampal glutamate function. **Brain Res**, v. 1135, n. 1, p. 129-35, 2007.

RAY, M. T.; SHANNON WEICKERT, C.; WEBSTER, M. J. Decreased BDNF and TrkB mRNA expression in multiple cortical areas of patients with schizophrenia and mood disorders. **Transl Psychiatry**, v. 4, p. e389, 2014.

REAGAN, L. P.; ROSELL, D. R.; WOOD, G. E. *et al.* Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: reversal by tianeptine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 2179-84, 2004.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 361, n. 1473, p. 1545-64, 2006.

REINER, A.; ARANT, R. J.; ISACOFF, E. Y. Assembly stoichiometry of the GluK2/GluK5 kainate receptor complex. **Cell Rep**, v. 1, n. 3, p. 234-40, 2012.

REUS, G. Z.; STRINGARI, R. B.; RIBEIRO, K. F. *et al.* Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 1, p. 166-71, 2011.

REUS, G. Z.; VIEIRA, F. G.; ABELAIRA, H. M. *et al.* MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. **J Psychiatr Res**, v. 55, p. 15-21, 2014.

ROBERT, S. M.; OGUNRINU-BABARINDE, T.; HOLT, K. T. *et al.* Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. **Neurochem Int**, v. 73, p. 181-91, 2014.

ROBISON, A. J. Emerging role of CaMKII in neuropsychiatric disease. **Trends Neurosci**, v. 37, n. 11, p. 653-62, 2014.

- ROBISON, A. J.; VIALOU, V.; SUN, H. S. *et al.* Fluoxetine epigenetically alters the CaMKII α promoter in nucleus accumbens to regulate DeltaFosB binding and antidepressant effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 5, p. 1178-86, 2014.
- RODRIGUES, A. L.; DA SILVA, G. L.; MATEUSSI, A. S. *et al.* Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 1347-58, 2002.
- ROMANOSKI, C. E.; CHE, N.; YIN, F. *et al.* Network for activation of human endothelial cells by oxidized phospholipids: a critical role of heme oxygenase 1. **Circ Res**, v. 109, n. 5, p. e27-41, 2011.
- ROOHANI, N.; HURRELL, R.; KELISHADI, R. *et al.* Zinc and its importance for human health: An integrative review. **J Res Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 144-57, 2013.
- ROOMRUANGWONG, C.; KANCHANATAWAN, B.; SIRIVICHAYAKUL, S. *et al.* Lower Serum Zinc and Higher CRP Strongly Predict Prenatal Depression and Physio-somatic Symptoms, Which All Together Predict Postnatal Depressive Symptoms. **Mol Neurobiol**, 2016.
- ROSA, A. O.; KASTER, M. P.; BINFARE, R. W. *et al.* Antidepressant-like effect of the novel thiazolidinone NP031115 in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1549-56, 2008.
- ROSA, A. O.; LIN, J.; CALIXTO, J. B. *et al.* Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. **Behav Brain Res**, v. 144, n. 1-2, p. 87-93, 2003.
- ROSA, J. M.; DAFRE, A. L.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like responses in the forced swimming test elicited by glutathione and redox modulation. **Behav Brain Res**, v. 253, p. 165-72, 2013.
- RUHE, H. G.; VAN ROOIJEN, G.; SPIJKER, J. *et al.* Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. **J Affect Disord**, v. 137, n. 1-3, p. 35-45, 2011.
- RUSSO, S. J.; NESTLER, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 609-25, 2013.
- RYBKA, J.; KEDZIORA-KORNATOWSKA, K.; BANAS-LEZANSKA, P. *et al.* Interplay between the pro-oxidant and antioxidant systems and proinflammatory cytokine levels, in relation to iron metabolism and the erythron in depression. **Free Radic Biol Med**, v. 63, p. 187-94, 2013.
- RYTER, S. W.; CHOI, A. M. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. **Transl Res**, 2015.

RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 2, p. 289-309, 2000.

RYU, J. M.; LEE, M. Y.; YUN, S. P. *et al.* Zinc chloride stimulates DNA synthesis of mouse embryonic stem cells: involvement of PI3K/Akt, MAPKs, and mTOR. **J Cell Physiol**, v. 218, n. 3, p. 558-67, 2009.

SACHS, B. D.; JACOBSEN, J. P.; THOMAS, T. L. *et al.* The effects of congenital brain serotonin deficiency on responses to chronic fluoxetine. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e291, 2013.

SALAZAR, G.; CRAIGE, B.; LOVE, R. *et al.* Vglut1 and ZnT3 co-targeting mechanisms regulate vesicular zinc stores in PC12 cells. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 9, p. 1911-21, 2005.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A. *et al.* Zinc status and immune system relationship: a review. **Biol Trace Elem Res**, v. 76, n. 3, p. 193-205, 2000a.

SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A. *et al.* Zinc as an essential micro nutrient: a review. **Nutrition Research**, v. 20, n. 5, p. 737-755, 2000b.

SALIMI, S.; KIANPOOR, M.; ABASSI, M. *et al.* Lower total serum protein, albumin and zinc in depression in an Iranian population. **J. Med. Sci.**, v. 8, p. 587-590, 2008.

SALOMON, R. M.; MILLER, H. L.; KRYSTAL, J. H. *et al.* Lack of behavioral effects of monoamine depletion in healthy subjects. **Biol Psychiatry**, v. 41, n. 1, p. 58-64, 1997.

SAMARDZIC, J.; SAVIC, K.; STEFANOVIC, N. *et al.* Anxiolytic and antidepressant effect of zinc on rats and its impact on general behavioural parameters. **Vojnosanit Pregl**, v. 70, n. 4, p. 391-5, 2013.

SANACORA, G.; BANASR, M. From pathophysiology to novel antidepressant drugs: glial contributions to the pathology and treatment of mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1172-9, 2013.

SANACORA, G.; KENDELL, S. F.; LEVIN, Y. *et al.* Preliminary evidence of riluzole efficacy in antidepressant-treated patients with residual depressive symptoms. **Biol Psychiatry**, v. 61, n. 6, p. 822-5, 2007.

SANACORA, G.; SMITH, M. A.; PATHAK, S. *et al.* Lanicemine: a low-trapping NMDA channel blocker produces sustained antidepressant efficacy with minimal psychotomimetic adverse effects. **Mol Psychiatry**, v. 19, n. 9, p. 978-85, 2014.

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

SANACORA, G.; ZARATE, C. A.; KRYSTAL, J. H. *et al.* Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 5, p. 426-37, 2008.

SAPOLSKY, R. M. Stress hormones: good and bad. **Neurobiol Dis**, v. 7, n. 5, p. 540-2, 2000.

SARANDOL, A.; SARANDOL, E.; EKER, S. S. *et al.* Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. **Hum Psychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 67-73, 2007.

SAVITZ, J.; DREVETS, W. C. Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 5, p. 699-771, 2009.

SAWADA, T.; YOKOI, K. Effect of zinc supplementation on mood states in young women: a pilot study. **Eur J Clin Nutr**, v. 64, n. 3, p. 331-3, 2010.

SCHECHTER, M. D.; CHANCE, W. T. Non-specificity of "behavioral despair" as an animal model of depression. **Eur J Pharmacol**, v. 60, n. 2-3, p. 139-42, 1979.

SCHECTERSON, L. C.; SANCHEZ, J. T.; RUBEL, E. W. *et al.* TrkB downregulation is required for dendrite retraction in developing neurons of chicken nucleus magnocellularis. **J Neurosci**, v. 32, n. 40, p. 14000-9, 2012.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, 1965.

SCHIPPER, H. M. Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. **Exp Gerontol**, v. 35, n. 6-7, p. 821-30, 2000.

_____. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 12, p. 1995-2011, 2004.

SCHIPPER, H. M.; SONG, W. A heme oxygenase-1 transducer model of degenerative and developmental brain disorders. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 3, p. 5400-19, 2015.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 12, p. 2378-91, 2010.

SCHOUSBOE, A.; BAK, L. K.; WAAGEPETERSEN, H. S. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 102, 2013.

SEN, S.; DUMAN, R.; SANACORA, G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 527-32, 2008.

SENSI, S. L.; PAOLETTI, P.; BUSH, A. I. *et al.* Zinc in the physiology and pathology of the CNS. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 780-91, 2009.

SENSI, S. L.; PAOLETTI, P.; KOH, J. Y. *et al.* The neurophysiology and pathology of brain zinc. **J Neurosci**, v. 31, n. 45, p. 16076-85, 2011.

SERRETTI, A.; MANDELLI, L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 10, p. 1259-72, 2010.

SHANKAR, A. H.; PRASAD, A. S. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. **Am J Clin Nutr**, v. 68, n. 2 Suppl, p. 447S-463S, 1998.

SHARMA, S.; EBADI, M. Significance of metallothioneins in aging brain. **Neurochem Int**, v. 65, p. 40-8, 2014.

SHELDON, A. L.; ROBINSON, M. B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. **Neurochem Int**, v. 51, n. 6-7, p. 333-55, 2007.

SHELLINE, Y. I. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 3, p. 338-52, 2003.

_____. Depression and the hippocampus: cause or effect? **Biol Psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 308-9, 2011.

SHELTON, R. C.; MANIER, D. H.; PETERSON, C. S. *et al.* Cyclic AMP-dependent protein kinase in subtypes of major depression and normal volunteers. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 2, n. 3, p. 187-192, 1999.

SHIMIZU, E.; HASHIMOTO, K.; OKAMURA, N. *et al.* Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. **Biol Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 70-5, 2003.

SHIRAYAMA, Y.; CHEN, A. C.; NAKAGAWA, S. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **J Neurosci**, v. 22, n. 8, p. 3251-61, 2002.

SI, X.; MIGUEL-HIDALGO, J. J.; O'DWYER, G. *et al.* Age-dependent reductions in the level of glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex in major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 11, p. 2088-96, 2004.

SIEGRIST, J.; LUNAU, T.; WAHRENDORF, M. *et al.* Depressive symptoms and psychosocial stress at work among older employees in three continents. **Global Health**, v. 8, p. 27, 2012.

SILVA, M. T.; GALVAO, T. F.; MARTINS, S. S. *et al.* Prevalence of depression morbidity among Brazilian adults: a systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 36, p. 262-270, 2014.

SINDREU, C.; BAYES, A.; ALTAF AJ, X. *et al.* Zinc transporter-1 concentrates at the postsynaptic density of hippocampal synapses. **Mol Brain**, v. 7, p. 16, 2014.

SINDREU, C.; PALMITER, R. D.; STORM, D. R. Zinc transporter ZnT-3 regulates presynaptic Erk1/2 signaling and hippocampus-dependent memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 8, p. 3366-70, 2011.

SIWEK, M.; DUDEK, D.; PAUL, I. A. *et al.* Zinc supplementation augments efficacy of imipramine in treatment resistant patients: a double blind, placebo-controlled study. **J Affect Disord**, v. 118, n. 1-3, p. 187-95, 2009.

SIWEK, M.; DUDEK, D.; SCHLEGEL-ZAWADZKA, M. *et al.* Serum zinc level in depressed patients during zinc supplementation of imipramine treatment. **J Affect Disord**, v. 126, n. 3, p. 447-52, 2010.

SIWEK, M.; SOWA-KUCMA, M.; STYCZEN, K. *et al.* Decreased serum zinc concentration during depressive episode in patients with bipolar disorder. **J Affect Disord**, v. 190, p. 272-7, 2016.

SIWEK, M.; SZEWCZYK, B.; DUDEK, D. *et al.* Zinc as a marker of affective disorders. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 6, p. 1512-8, 2013.

SMITH, E. G.; DELIGIANNIDIS, K. M.; ULBRICHT, C. M. *et al.* Antidepressant augmentation using the N-methyl-D-aspartate antagonist memantine: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **J Clin Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 966-73, 2013.

SMITH, T. W.; PECK, J. R.; WARD, J. R. Helplessness and depression in rheumatoid arthritis. **Health Psychol**, v. 9, n. 4, p. 377-89, 1990.

SOLATI, Z.; JAZAYERI, S.; TEHRANI-DOOST, M. *et al.* Zinc monotherapy increases serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and decreases depressive symptoms in overweight or obese subjects: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Nutr Neurosci**, v. 18, p. 162-168, 2015.

SONI, N.; REDDY, B. V.; KUMAR, P. GLT-1 transporter: an effective pharmacological target for various neurological disorders. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 127, p. 70-81, 2014.

SOWA-KUCMA, M.; KOWALSKA, M.; SZLOSARCZYK, M. *et al.* Chronic treatment with zinc and antidepressants induces enhancement of presynaptic/extracellular zinc concentration in the rat prefrontal cortex. **Amino Acids**, v. 40, n. 1, p. 249-58, 2011.

SOWA-KUCMA, M.; LEGUTKO, B.; SZEWCZYK, B. *et al.* Antidepressant-like activity of zinc: further behavioral and molecular evidence. **J Neural Transm**, v. 115, n. 12, p. 1621-8, 2008.

SOWA-KUCMA, M.; SZEWCZYK, B.; SADLIK, K. *et al.* Zinc, magnesium and NMDA receptor alterations in the hippocampus of suicide victims. **J Affect Disord**, v. 151, n. 3, p. 924-31, 2013.

STANLEY, P. C.; WAKWE, V. C. Toxic trace metals in the mentally ill patients. **Niger Postgrad Med J**, v. 9, n. 4, p. 199-204, 2002.

STEINBERG, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1341-78, 2008.

STEPTOE, A.; HAMER, M.; CHIDA, Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 7, p. 901-12, 2007.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B. *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

STONE, T. W.; ADDAE, J. I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. **Eur J Pharmacol**, v. 447, n. 2-3, p. 285-96, 2002.

SUH, S. W.; CHEN, J. W.; MOTAMEDI, M. *et al.* Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury. **Brain Res**, v. 852, n. 2, p. 268-73, 2000.

SUN, H. S.; HUI, K.; LEE, D. W. *et al.* Zn²⁺ sensitivity of high- and low-voltage activated calcium channels. **Biophys J**, v. 93, n. 4, p. 1175-83, 2007.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-80, 2003.

SWARDFAGER, W.; HERRMANN, N.; MCINTYRE, R. S. *et al.* Potential roles of zinc in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. **Neurosci Biobehav Rev**, 2013.

SZEWCZYK, B.; BRANSKI, P.; WIERONSKA, J. M. *et al.* Interaction of zinc with antidepressants in the forced swimming test in mice. **Pol J Pharmacol**, v. 54, n. 6, p. 681-5, 2002.

SZEWCZYK, B.; KUBERA, M.; NOWAK, G. The role of zinc in neurodegenerative inflammatory pathways in depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 693-701, 2010.

SZEWCZYK, B.; POCHWAT, B.; RAFALO, A. *et al.* Activation of mTOR dependent signaling pathway is a necessary mechanism of antidepressant-like activity of zinc. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 517-26, 2015.

SZEWCZYK, B.; POLESZAK, E.; SOWA-KUCMA, M. *et al.* Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. **Pharmacol Rep**, v. 60, n. 5, p. 588-9, 2008.

SZEWCZYK, B.; POLESZAK, E.; WLAZ, P. *et al.* The involvement of serotonergic system in the antidepressant effect of zinc in the forced swim test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 323-9, 2009.

TAKAMORI, S. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? **Neurosci Res**, v. 55, n. 4, p. 343-51, 2006.

TAKEDA, A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 34, n. 3, p. 137-48, 2000.

_____. Zinc signaling in the hippocampus and its relation to pathogenesis of depression. **J Trace Elem Med Biol**, v. 26, n. 2-3, p. 80-4, 2012.

_____. Significance of Zn(2+) signaling in cognition: insight from synaptic Zn(2+) dyshomeostasis. **J Trace Elem Med Biol**, v. 28, n. 4, p. 393-6, 2014.

TAKEDA, A.; MINAMI, A.; TAKEFUTA, S. *et al.* Zinc homeostasis in the brain of adult rats fed zinc-deficient diet. **J Neurosci Res**, v. 63, n. 5, p. 447-52, 2001.

TAKEDA, A.; TAKEFUTA, S.; OKADA, S. *et al.* Relationship between brain zinc and transient learning impairment of adult rats fed zinc-deficient diet. **Brain Res**, v. 859, n. 2, p. 352-7, 2000.

TAKIZAWA, S.; HIRABAYASHI, H.; MATSUSHIMA, K. *et al.* Induction of heme oxygenase protein protects neurons in cortex and striatum, but not in hippocampus, against transient forebrain ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 18, n. 5, p. 559-69, 1998.

TALAROWSKA, M.; BOBINSKA, K.; ZAJACZKOWSKA, M. *et al.* Impact of oxidative/nitrosative stress and inflammation on cognitive functions in patients with recurrent depressive disorders. **Med Sci Monit**, v. 20, p. 110-5, 2014.

TALIAZ, D.; LOYA, A.; GERSNER, R. *et al.* Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. **J Neurosci**, v. 31, n. 12, p. 4475-83, 2011.

TAMANO, H.; KAN, F.; KAWAMURA, M. *et al.* Behavior in the forced swim test and neurochemical changes in the hippocampus in young rats after 2-week zinc deprivation. **Neurochem Int**, v. 55, n. 7, p. 536-41, 2009.

TANAKA, N.; IKEDA, Y.; OHTA, Y. *et al.* Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. **Brain Res**, v. 1370, p. 246-53, 2011.

TAPIERO, H.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomed Pharmacother**, v. 57, n. 9, p. 399-411, 2003.

TARDITO, D.; PEREZ, J.; TIRABOSCHI, E. *et al.* Signaling pathways regulating gene expression, neuroplasticity, and neurotrophic mechanisms in the action of antidepressants: a critical overview. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 1, p. 115-34, 2006.

TASSABEHJI, N. M.; CORNIOLA, R. S.; ALSHINGITI, A. *et al.* Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. **Physiol Behav**, v. 95, n. 3, p. 365-9, 2008.

THAIPISUTTIKUL, P.; ITTASAKUL, P.; WALEEPRAKHON, P. *et al.* Psychiatric comorbidities in patients with major depressive disorder. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 10, p. 2097-103, 2014.

THIERRY, B.; STERU, L.; SIMON, P. *et al.* The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 90, n. 2, p. 284-5, 1986.

THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, v. 270, n. 5236, p. 593-8, 1995.

THOMPSON RAY, M.; WEICKERT, C. S.; WYATT, E. *et al.* Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. **J Psychiatry Neurosci**, v. 36, n. 3, p. 195-203, 2011.

TIRABOSCHI, E.; GIAMBELLI, R.; D'URSO, G. *et al.* Antidepressants activate CaMKII in neuron cell body by Thr286 phosphorylation. **Neuroreport**, v. 15, n. 15, p. 2393-6, 2004.

TRAKSHEL, G. M.; KUTTY, R. K.; MAINES, M. D. Resolution of the rat brain heme oxygenase activity: absence of a detectable amount of the inducible form (HO-1). **Arch Biochem Biophys**, v. 260, n. 2, p. 732-9, 1988.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res**, v. 53, n. 4, p. 865-71, 2002.

TURPAEV, K. T. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. **Biochemistry (Mosc)**, v. 78, n. 2, p. 111-26, 2013.

UHER, R.; MORS, O.; RIETSCHER, M. *et al.* Early and delayed onset of response to antidepressants in individual trajectories of change during treatment of major depression: a secondary analysis of data from the Genome-Based Therapeutic Drugs for Depression (GENDEP) study. **J Clin Psychiatry**, v. 72, n. 11, p. 1478-84, 2011.

VAN KEMPEN, G. M.; GOEKOOP, J. G.; DE WOLFF, F. A. [Plasma copper and zinc in psychiatric patients]. **Ned Tijdschr Geneeskd**, v. 129, n. 12, p. 550-3, 1985.

VAN RIEL, E.; MEIJER, O. C.; STEENBERGEN, P. J. *et al.* Chronic unpredictable stress causes attenuation of serotonin responses in cornu ammonis 1 pyramidal neurons. **Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 649-58, 2003.

VANDENBERG, R. J.; MITROVIC, A. D.; JOHNSTON, G. A. Molecular basis for differential inhibition of glutamate transporter subtypes by zinc ions. **Mol Pharmacol**, v. 54, n. 1, p. 189-96, 1998.

VANDENBERG, R. J.; RYAN, R. M. Mechanisms of glutamate transport. **Physiol Rev**, v. 93, n. 4, p. 1621-57, 2013.

VASHUM, K. P.; MCEVOY, M.; MILTON, A. H. *et al.* Dietary zinc is associated with a lower incidence of depression: Findings from two Australian cohorts. **J Affect Disord**, v. 166, p. 249-57, 2014.

VELAZQUEZ, K. T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S. M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 6, p. 578-89, 2007.

VIDEBECH, P.; RAVNKILDE, B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 11, p. 1957-66, 2004.

VOGT, K.; MELLOR, J.; TONG, G. *et al.* The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. **Neuron**, v. 26, n. 1, p. 187-96, 2000.

VOHRINGER, P. A.; GHAEMI, S. N. Solving the antidepressant efficacy question: effect sizes in major depressive disorder. **Clin Ther**, v. 33, n. 12, p. B49-61, 2011.

VON BULOW, V.; DUBBEN, S.; ENGELHARDT, G. *et al.* Zinc-dependent suppression of TNF-alpha production is mediated by protein kinase A-induced inhibition of Raf-1, I kappa B kinase beta, and NF-kappa B. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 4180-6, 2007.

VYTHILINGAM, M.; VERMETTEN, E.; ANDERSON, G. M. *et al.* Hippocampal volume, memory, and cortisol status in major depressive disorder: effects of treatment. **Biol Psychiatry**, v. 56, n. 2, p. 101-12, 2004.

WANG, R.; TU, J.; ZHANG, Q. *et al.* Genistein attenuates ischemic oxidative damage and behavioral deficits via eNOS/Nrf2/HO-1 signaling. **Hippocampus**, v. 23, n. 7, p. 634-47, 2013.

WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**, v. 15, n. 11, p. 1382-402, 2010.

WANG, Z.; LI, J. Y.; DAHLSTROM, A. *et al.* Zinc-enriched GABAergic terminals in mouse spinal cord. **Brain Res**, v. 921, n. 1-2, p. 165-72, 2001.

WANG, Z. Y.; STOLTENBERG, M.; HUANG, L. *et al.* Abundant expression of zinc transporters in Bergman glia of mouse cerebellum. **Brain Res Bull**, v. 64, n. 5, p. 441-8, 2005.

WATANABE, M.; TAMANO, H.; KIKUCHI, T. *et al.* Susceptibility to stress in young rats after 2-week zinc deprivation. **Neurochem Int**, v. 56, n. 3, p. 410-6, 2010.

WATERHOUSE, E. G.; XU, B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. **Mol Cell Neurosci**, v. 42, n. 2, p. 81-9, 2009.

WEI, H. J.; XU, J. H.; LI, M. H. *et al.* Hydrogen sulfide inhibits homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal apoptosis in rat hippocampus via upregulation of the BDNF-TrkB pathway. **Acta Pharmacol Sin**, v. 35, n. 6, p. 707-15, 2014.

WESSELLS, K. R.; BROWN, K. H. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50568, 2012.

WHITTLE, N.; LUBEC, G.; SINGEWALD, N. Zinc deficiency induces enhanced depression-like behaviour and altered limbic activation reversed by antidepressant treatment in mice. **Amino Acids**, v. 36, n. 1, p. 147-58, 2009.

WHO, W. H. O. **The global burden of disease: 2004 update**. WHO PRESS, W. H. O. Geneva 2008.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 319-29, 1997.

_____. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90-110, 2005.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 16, n. 4, p. 525-34, 1992.

WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D. *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 93, n. 3, p. 358-64, 1987.

WOJCIK, J.; DUDEK, D.; SCHLEGEL-ZAWADZKA, M. *et al.* Antepartum/postpartum depressive symptoms and serum zinc and magnesium levels. **Pharmacol Rep**, v. 58, n. 4, p. 571-6, 2006.

WON, S. J.; YOO, B. H.; BRENNAN, A. M. *et al.* EAAC1 gene deletion alters zinc homeostasis and exacerbates neuronal injury after transient cerebral ischemia. **J Neurosci**, v. 30, n. 46, p. 15409-18, 2010.

WONG, E. Y.; HERBERT, J. The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 10, p. 2491-8, 2004.

WROBEL, A.; SEREFKO, A.; WLAZ, P. *et al.* The effect of imipramine, ketamine, and zinc in the mouse model of depression. **Metab Brain Dis**, v. 30, n. 6, p. 1379-86, 2015.

WU, C. C.; HSU, M. C.; HSIEH, C. W. *et al.* Upregulation of heme oxygenase-1 by Epigallocatechin-3-gallate via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and ERK pathways. **Life Sci**, v. 78, n. 25, p. 2889-97, 2006.

WU, F. Y.; WU, C. W. Zinc in DNA replication and transcription. **Annu Rev Nutr**, v. 7, p. 251-72, 1987.

WU, J.; SONG, T. B.; LI, Y. J. *et al.* Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKC β expression and translocation in offspring rats. **Brain Res**, v. 1141, p. 205-13, 2007.

WYLLIE, D. J.; LIVESSEY, M. R.; HARDINGHAM, G. E. Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. **Neuropharmacology**, v. 74, p. 4-17, 2013.

XING, G.; RUSSELL, S.; HOUGH, C. *et al.* Decreased prefrontal CaMKII alpha mRNA in bipolar illness. **Neuroreport**, v. 13, n. 4, p. 501-5, 2002.

XIONG, F.; ZHANG, L. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. **Front Neuroendocrinol**, v. 34, n. 1, p. 27-46, 2013.

YANG, Y.; JING, X. P.; ZHANG, S. P. *et al.* High dose zinc supplementation induces hippocampal zinc deficiency and memory impairment with inhibition of BDNF signaling. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55384, 2013.

YASUDA, S.; MIYAZAKI, T.; MUNECHIKA, K. *et al.* Isolation of Zn²⁺ as an endogenous agonist of GPR39 from fetal bovine serum. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 27, n. 4, p. 235-46, 2007.

YEH, F. C.; KAO, C. F.; KUO, P. H. Explore the Features of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Mood Disorders. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128605, 2015.

YOUNG, E. A.; CARLSON, N. E.; BROWN, M. B. Twenty-four-hour ACTH and cortisol pulsatility in depressed women. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 2, p. 267-76, 2001.

YUAN, P.; ZHOU, R.; WANG, Y. *et al.* Altered levels of extracellular signal-regulated kinase signaling proteins in postmortem frontal cortex of individuals with mood disorders and schizophrenia. **J Affect Disord**, v. 124, n. 1-2, p. 164-9, 2010.

YUAN, Y.; NIU, F.; LIU, Y. *et al.* Zinc and its effects on oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurol Sci**, v. 35, n. 6, p. 923-8, 2014.

ZARATE, C., JR.; MACHADO-VIEIRA, R.; HENTER, I. *et al.* Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? **Harv Rev Psychiatry**, v. 18, n. 5, p. 293-303, 2010.

ZARATE, C. A., JR.; MATHEWS, D.; IBRAHIM, L. *et al.* A randomized trial of a low-trapping nonselective N-methyl-D-aspartate channel blocker in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 74, n. 4, p. 257-64, 2013.

ZARATE, C. A., JR.; PAYNE, J. L.; QUIROZ, J. *et al.* An open-label trial of riluzole in patients with treatment-resistant major depression. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 1, p. 171-4, 2004.

ZARATE, C. A., JR.; SINGH, J. B.; CARLSON, P. J. *et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856-64, 2006.

ZENI, A. L.; ZOMKOWSKI, A. D.; MARASCHIN, M. *et al.* Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of

ferulic acid in the tail suspension test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 181-6, 2012.

ZHANG, X.; XIAO, Z.; YAO, J. *et al.* Participation of protein kinase C in the activation of Nrf2 signaling by ischemic preconditioning in the isolated rabbit heart. **Mol Cell Biochem**, v. 372, n. 1-2, p. 169-79, 2013a.

ZHANG, X. H.; JIA, N.; ZHAO, X. Y. *et al.* Involvement of pGluR1, EAAT2 and EAAT3 in offspring depression induced by prenatal stress. **Neuroscience**, v. 250, p. 333-41, 2013b.

ZHANG, Y.; LIU, L.; LIU, Y. Z. *et al.* NLRP3 Inflammasome Mediates Chronic Mild Stress-induced Depression in Mice via Neuroinflammation. **Int J Neuropsychopharmacol**, 2015.

ZHAO, Y.; MA, R.; SHEN, J. *et al.* A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. **Eur J Pharmacol**, v. 581, n. 1-2, p. 113-20, 2008.

ZHOU, W.; WANG, N.; YANG, C. *et al.* Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. **Eur Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 419-23, 2014.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. GABA and Glutamate Transporters in Brain. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 165, 2013.

ZINK, M.; RAPP, S.; DONEV, R. *et al.* Fluoxetine treatment induces EAAT2 expression in rat brain. **J Neural Transm**, v. 118, n. 6, p. 849-55, 2011.

ZINK, M.; VOLLMAYR, B.; GEBICKE-HAERTER, P. J. *et al.* Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 2, p. 465-73, 2010.

ZOU, W.; CHEN, C.; ZHONG, Y. *et al.* PI3K/Akt pathway mediates Nrf2/ARE activation in human L02 hepatocytes exposed to low-concentration HBCDs. **Environ Sci Technol**, v. 47, n. 21, p. 12434-40, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Estudos clínicos relacionando zinco e depressão

Estudos clínicos		
População (Referência)	Parâmetro clínico / Tratamento	Principais efeitos
Pacientes com depressão ¹ (VAN KEMPEN, GOEKOOP e DE WOLFF, 1985)	- Avaliação da relação cobre:zinco	- Pacientes depressivos tinham aumento da relação cobre:zinco.
30 pacientes com depressão (LITTLE <i>et al.</i> , 1989)	- Avaliação do zinco sérico	- Pacientes com depressão tinham maior prevalência de deficiência de zinco.
14 pacientes com depressão e 14 controles (MCLOUGHLIN e HODGE, 1990)	- Avaliação do zinco plasmático	- Pacientes com depressão tinham níveis plasmáticos de zinco diminuídos.
35 pacientes com depressão, 35 pacientes tratados e 35 controles (NARANG <i>et al.</i> , 1991)	- Avaliação do zinco sérico	- Pacientes tratados tinham níveis séricos de zinco maior que indivíduos com depressão. - Sem diferença entre os níveis de zinco sérico entre pacientes depressivos e controles.
48 pacientes com depressão e 32 controles (MAES <i>et al.</i> , 1994)	- Avaliação do zinco sérico	- Pacientes com depressão tinham níveis séricos de zinco diminuídos.
31 pacientes com depressão e 15 controles (MAES <i>et al.</i> , 1997)	- Avaliação do zinco sérico	- Zinco sérico era menor em indivíduos resistentes ao tratamento. - Correlação inversa entre zinco sérico e severidade da depressão.

48 pacientes com depressão e 15 controles (MAES <i>et al.</i> , 1999)	- Avaliação do zinco sérico	- Pacientes com depressão tinham níveis séricos de zinco diminuídos.
50 idosos hospitalizados (PEPERSACK <i>et al.</i> , 2001)	- Avaliação do zinco plasmático	- Pacientes deficientes em zinco tinham mais sintomas de depressão.
21 pacientes com depressão, 20 com transtorno bipolar, 20 com esquizofrenia e 20 controles (STANLEY e WAKWE, 2002)	- Avaliação do zinco sérico	- Zinco sérico estava diminuído em pacientes acometidos pelas três doenças.
14 pacientes com depressão (NOWAK <i>et al.</i> , 2003a)	- Suplementação com zinco (25 mg/dia de zinco elementar) (n=6) ou placebo (n=8) + antidepressivo por 2, 6 ou 12 semanas	- Pacientes suplementados com zinco (por 6 ou 12 semanas) tinham uma redução dos sintomas depressivos comparado com quem recebeu somente antidepressivo.
46 pacientes com depressão e 32 controles (MOUSAVI, HABIBOLLAHI e MAHMOUDIAN, 2006)	- Avaliação do zinco sérico	- Zinco sérico foi menor em pacientes com depressão comparado com indivíduos sem a doença.
62 mulheres (WOJCIK <i>et al.</i> , 2006)	- Avaliação do zinco sérico	- Relação entre zinco sérico diminuído e maior severidade dos sintomas de depressão pós-parto.

144 pacientes com depressão e 161 controles (SALIMI <i>et al.</i> , 2008)	- Avaliação do zinco sérico	- Zinco sérico foi menor em pacientes com depressão comparado com indivíduos sem a doença.
60 pacientes com depressão (SIWEK <i>et al.</i> , 2009)	- Suplementação com zinco (25 mg/dia de zinco elementar) (n=30) ou placebo (n=30) + antidepressivo imipramina por 12 semanas	- Em pacientes não resistentes ao tratamento com imipramina, a suplementação com zinco não influenciou nos sintomas depressivos. - Em pacientes resistentes ao tratamento com imipramina, a suplementação com zinco melhorou os sintomas depressivos.
23 pacientes com depressão moderada ou severa e 23 controles (AMANI <i>et al.</i> , 2010)	- Avaliação do zinco sérico - Avaliação do zinco dietético	- Pacientes com depressão tinham menos zinco sérico e menor ingestão de zinco dietético do que os indivíduos sem o transtorno. - Diminuição do zinco sérico foi correlacionado com um aumento dos sintomas depressivos.
88 pacientes com depressão e 88 controles (IRMISCH, SCHLAEFKE e RICHTER, 2010)	- Avaliação do zinco sérico	- Correlação inversa entre os níveis séricos de zinco e gravidade da depressão.
30 mulheres jovens sem depressão (SAWADA e YOKOI, 2010)	- Suplementação com multivitamínicos (controle) ou multivitamínicos + zinco (7 mg/dia por 10 semanas)	- Mulheres que receberam zinco tiveram diminuição dos sintomas de raiva, hostilidade e depressão.

<p>60 pacientes com depressão e 25 controles (SIWEK <i>et al.</i>, 2010)</p>	<p>- Avaliação do zinco sérico - Suplementação com zinco (25 mg/dia de zinco elementar) (n=30) ou placebo (n=30) + antidepressivo imipramina por 12 semanas</p>	<p>- Zinco sérico foi menor em pacientes com depressão comparado com indivíduos sem a doença. - Pacientes tratados com o antidepressivo imipramina tiveram níveis séricos de zinco aumentados. Entretanto, os pacientes resistentes ao tratamento tiveram um menor aumento nos níveis de zinco comparado com os pacientes não resistentes. - Concentrações de zinco foram maiores em pacientes suplementados com zinco comparado com os suplementados com placebo.</p>
<p>2163 mulheres e 1545 homens (MASEREJIAN, HALL e MCKINLAY, 2012)</p>	<p>- Avaliação do zinco dietético ou suplementado</p>	<p>- Mulheres, mas não homens, que tinham ingestão menor de zinco (dietético ou suplementado) tinham maior probabilidade de apresentar sintomas depressivos.</p>
<p>2317 homens com fator de risco de doença coronária isquêmica (LEHTO <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>- Estudo prospectivo de 20 anos - Avaliação do zinco dietético</p>	<p>- Ingestão dietética de zinco não influenciou na prevenção da depressão.</p>
<p>38 pacientes com depressão (RANJBAR <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>- Suplementação com zinco (25 mg/dia de zinco elementar) (n=21) ou placebo (n=17) + antidepressivo (citalopram ou fluoxetina) por 12 semanas</p>	<p>- Suplementação com zinco e antidepressivo melhorou mais os sintomas depressivos comparado com quem usou apenas antidepressivo.</p>

<p>17 vítimas de suicídio e 6 mortes repentinas (SOWA-KUCMA <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>- Investigação da capacidade do zinco e magnésio em inibir a ligação do MK-801 no receptor NMDA</p>	<p>- No hipocampo de vítimas de suicídio houve uma diminuição na potência do zinco e magnésio em inibir a ligação do MK-801 no receptor NMDA. - Essas alterações foram associadas com aumento dos níveis do GluN2A e diminuição do GluN2B e PSD-95.</p>
<p>30 pacientes em hemodiálise com depressão e 30 controle (HASSAN <i>et al.</i>, 2014)</p>	<p>- Avaliação do zinco sérico</p>	<p>- Correlação inversa entre os níveis séricos de zinco e a gravidade da depressão.</p>
<p>17 vítimas de suicídio e 6 morte repentinas (MLYNIIEC <i>et al.</i>, 2014)</p>	<p>- Avaliação da expressão do GPR39 no hipocampo e córtex frontal</p>	<p>- Vítimas de suicídio zinco tiveram diminuição na expressão do GPR39 no hipocampo e no córtex frontal.</p>
<p>37 pacientes com depressão (RANJBAR <i>et al.</i>, 2014)</p>	<p>- Suplementação com sulfato de zinco (25 mg/dia de zinco elementar) (n=20) ou placebo (n=17) + antidepressivo (citalopram ou fluoxetina) por 12 semanas</p>	<p>- Suplementação com zinco e antidepressivo melhorou mais os sintomas depressivos do que apenas o uso de antidepressivo. - Não foi encontrada diferença nos níveis de BDNF, interleucina-6 e fator de necrose tumoral-α.</p>
<p>2092 pessoas (duas coortes Australianas) (VASHUM <i>et al.</i>, 2014)</p>	<p>- Avaliação do zinco dietético</p>	<p>- Associação inversa entre ingestão de zinco dietético e risco de depressão.</p>

46 pessoas com sobrepeso ou obesas (SOLATI <i>et al.</i> , 2015)	- Suplementação com zinco (30 mg/dia de zinco elementar) por 12 semanas	- Suplementação de zinco aumentou os níveis séricos de zinco e de BDNF. - Suplementação de zinco diminuiu sintomas depressivos.
122 mulheres pós-parto (EDALATI-FARD <i>et al.</i> , 2016)	- Avaliação do zinco sérico	- Mulheres com sintomas de depressão pós-parto não tinham alteração nos níveis séricos de zinco.
Mulheres não grávidas e mulheres grávidas (com ou sem depressão) ¹ (ROOMRUANG WONG <i>et al.</i> , 2016)	- Avaliação do zinco sérico	- Zinco sérico foi menor em mulheres gestantes do que em não gestantes. - Zinco sérico foi menor em mulheres gestantes com depressão quando comparado com mulheres não gestantes ou mulheres gestantes sem depressão. - Níveis diminuídos de zinco sérico foram associados com sintomas de depressão pré-natal e pós-natal.
129 pacientes com transtorno bipolar (58 na fase depressiva, 23 na fase maníaca e 48 em remissão) e 50 controles (SIWEK <i>et al.</i> , 2016)	- Avaliação do zinco sérico	- Zinco sérico estava diminuído em pacientes na fase depressiva quando comparado com pacientes na fase maníaca, na remissão ou sem transtorno bipolar.

¹ Número de indivíduos não informado.

Abreviaturas: BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; NMDA, N-metil-D-arpartato. Fonte: próprio autor.

APÊNDICE B - Estudos pré-clínicos relacionando zinco e depressão

Estudos pré-clínicos

Animal (Referência)	Parâmetro clínico / Tratamento	Principais efeitos
Camundongos <i>Swiss</i> albino machos (KROCZKA <i>et al.</i> , 2000)	- Sulfato de zinco (10 e 30 mg/kg, i.p.) – 3 doses (24h, 5h e 1h antes do teste)	- Zinco exerceu um efeito tipo- antidepressivo na dose de 30 mg/kg.
Camundongos <i>Swiss</i> albino machos Ratos <i>Wistar</i> machos (KROCZKA <i>et al.</i> , 2001)	- Sulfato de zinco (camundongos: 10 e 30 mg/kg, i.p.; ratos: 1, 5 e 30 mg/kg, i.p.) ou imipramina ou controle – 3 doses (24h, 5h e 1h antes do teste)	- Zinco exerceu um efeito tipo- antidepressivo em camundongos e ratos na dose de 30 mg/kg. - Em ratos, dose subativa de zinco (1 mg/kg) teve efeito sinérgico com dose subativa de imipramina (5 mg/kg).
Camundongos <i>Swiss</i> albino machos (SZEWCZYK <i>et</i> <i>al.</i> , 2002)	- Hidroaspartato de zinco (5, 10, 15 e 30 mg/kg, i.p.) ou controle - Antidepressivos imipramina, citalopram ou controle	- Zinco (30 mg/kg) exerceu efeito tipo-antidepressivo. - Dose subativa de zinco teve efeito sinérgico com antidepressivos.
Ratos <i>Wistar</i> machos (NOWAK <i>et al.</i> , 2003b)	- Hidroaspartato de zinco (65 mg/kg, i.p.) agudo, subcrônico (24h, 5h e 1h antes do teste) ou crônico (14 dias) - Animais submetidos à bulbectomia olfatória ou controle	- Administração aguda, subcrônica e crônica produziu um comportamento tipo- antidepressivo nos animais. - Tratamento crônico com zinco impediu os efeitos comportamentais induzidos pela bulbectomia olfatória.

<p>Camundongos <i>Swiss</i> de ambos os sexos (ROSA <i>et al.</i>, 2003)</p>	<p>- ZnCl₂ (5, 10 ou 30 mg/kg, i.p.) ou controle</p>	<p>- Zinco (nas doses de 10 ou 30 mg/kg – de acordo com o teste utilizado) induziu a um comportamento tipo-antidepressivo. - O efeito tipo-antidepressivo do zinco parece ser mediado, pelo menos em parte, pela interação com receptores NMDA e com a via da L-arginina-óxido nítrico.</p>
<p>Ratos <i>Wistar</i> machos (NOWAK <i>et al.</i>, 2004)</p>	<p>- Hidroaspartato de zinco (65 mg/kg, i.p.) por 14 dias</p>	<p>- Zinco aumentou o RNAm do BDNF no córtex cerebral, mas não no hipocampo.</p>
<p>Ratos <i>Wistar</i> fêmeas (BROCARDO <i>et al.</i>, 2007)</p>	<p>- ZnCl₂ (5 mg/kg, i.p.) ou controle por 3 dias - Malation ou controle</p>	<p>- Zinco impediu o comportamento tipo-depressivo induzido pelo malation. - Zinco impediu as alterações bioquímicas induzidas pelo malation (aumento de peroxidação lipídica no córtex cerebral e diminuição de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase e glutatona redutase no córtex cerebral e hipocampo, respectivamente).</p>
<p>- Ratos <i>Wistar</i> machos (CIESLIK <i>et al.</i>, 2007)</p>	<p>- Hidroaspartato de zinco (30 ou 15 mg/kg, i.p.), imipramina (5 mg/kg, i.p.) ou controle por 14 dias - Estresse crônico imprevisível por 16 dias</p>	<p>- Zinco (na dose de 30 mg/kg) protegeu os animais contra os efeitos comportamentais induzidos pelo estresse. - Coadministração de doses subefetivas de zinco (na dose de 15 mg/kg) com imipramina tiveram efeitos sinérgicos, impedindo os efeitos comportamentais induzidos pelo estresse.</p>

<p>Camundongos <i>Swiss</i> machos (CUNHA <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p>- ZnCl₂ (1, 10 e 30 mg/kg, p.o.) ou controle - Doses subativas de antidepressivos (fluoxetina, paroxetina, imipramina, desipramina e bupropiona)</p>	<p>- Zinco agudo teve efeito tipo-antidepressivo nas doses de 10 e 30 mg/kg. - Dose subativa de zinco (1 mg/kg) teve efeito sinérgico com doses subativas de antidepressivos.</p>
<p>Ratos <i>Wistar</i> machos (FRANCO <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p>- ZnCl₂ (5, 15 e 30 mg/kg, i.p.) ou controle 24h antes do teste - ZnCl₂ (1, 5 e 15 mg/kg, i.p.) ou controle por 7 dias - ZnCl₂ (300 mg/l na água de beber) ou controle por 30 dias</p>	<p>- Administração aguda de zinco não teve ação tipo-antidepressiva e a maior dose reduziu a atividade da glutatona redutase e glutatona S-transferase no hipocampo e córtex cerebral. - Zinco por 7 dias teve efeito tipo-antidepressivo na dose de 15 mg/kg. - Administração crônica de zinco teve efeito tipo-antidepressivo, aumentou a fosforilação da ERK1/2 e a expressão do BDNF no córtex cerebral. Além disso, aumentou os níveis de glutatona no hipocampo e córtex cerebral.</p>
<p>Camundongos <i>Swiss</i> de ambos os sexos (LOBATO <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p>- ZnCl₂ (30 mg/kg, i.p.) ou controle 30 min antes do teste</p>	<p>- Zinco teve efeito tipo-antidepressivo. - Efeito tipo-antidepressivo do zinco envolveu a ativação direta ou indireta de receptores de adenosina (A₁ e A_{2A}).</p>
<p>Camundongo <i>Swiss</i> albino machos (POLESZAK <i>et al.</i>, 2008)</p>	<p>- Hidroaspartato de zinco (5 mg/kg, i.p.)</p>	<p>- D-serina (agonista do sítio glicina do receptor NMDA) inibiu o efeito tipo-antidepressivo do zinco.</p>

<p>Ratos <i>Wistar</i> machos (SOWA-KUCMA <i>et al.</i>, 2008)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hidroaspartato de zinco (5, 10 e 20 mg/kg, i.p.) ou controle por 5 semanas. - Hidroaspartato de zinco (10 mg/kg) por 7, 14 e 35 dias. - Estresse crônico moderado por 8 semanas 	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamento com zinco por 5 semanas (apenas na dose de 10 mg/kg) induziu um efeito tipo-antidepressivo nos animais submetidos ao estresse. - 7, 14 e 35 dias de tratamento com zinco aumentou o RNAm do BDNF no hipocampo. 35 dias de tratamento aumentou o RNAm do BDNF no córtex. - 7 e 14 dias de tratamento com zinco aumentou os níveis de proteína do BDNF no hipocampo.
<p>Ratos <i>Sprague-Dawley</i> machos (TASSABEHJI <i>et al.</i>, 2008)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dieta adequada (30 ppm), deficiente (1ppm) ou suplementada em zinco (180 ppm) por 3 semanas 	<ul style="list-style-type: none"> - Ratos alimentados com dieta deficiente em zinco tiveram comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso. - Fluoxetina exerceu efeito tipo-antidepressivo em animais alimentados com dieta adequada ou suplementada com zinco, mas não foi efetivo em animais deficientes em zinco.
<p>Ratos <i>Wistar</i> machos (CICHY <i>et al.</i>, 2009)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hidroaspartato de zinco (65 mg/kg, p.o.) ou controle por 14 dias 	<ul style="list-style-type: none"> - Zinco reduziu a afinidade da glicina nos receptores NMDA no córtex frontal. - Zinco aumentou a densidade dos receptores de serotonina 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} no hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente.
<p>Camundongos <i>Swiss</i> albino machos Ratos <i>Wistar</i> machos (SZEWCZYK <i>et al.</i>, 2009)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hidroaspartato de zinco (2,5 e 5 mg/kg, i.p.) administrado agudo em camundongos ou por 3 vezes (24, 5 e 1h antes do 	<ul style="list-style-type: none"> - Associação de doses subativas de zinco (2,5 mg/kg) com antidepressivos propiciou um comportamento tipo-antidepressivo. - Efeito tipo-antidepressivo do zinco (5 mg/kg) envolveu, pelo menos em parte, o sistema

	teste) em ratos	serotoninérgico em camundongos. - Em ratos, as duas doses induziram um comportamento tipo-antidepressivo.
Ratos <i>Wistar</i> machos (TAMANO <i>et al.</i> , 2009)	- Dieta adequada em zinco (52,8 mg/kg) ou deficiente em zinco (0,37 mg/kg) por 2 semanas - Corticosterona (40 mg/kg, subcutânea) ou controle por 14 dias	- Nível basal de cálcio no hipocampo foi aumentado em animais alimentados com dieta deficiente de zinco e em animais submetidos à corticosterona. - Concentrações de glutamato, GABA e glutamina no hipocampo foram diminuídas na deficiência de zinco.
Camundongos C57BL/6N machos (WHITTLE, LUBEC e SINGEWALD, 2009)	- Dieta adequada em zinco (65 mg/kg) ou baixa em zinco (12,3 mg/kg) por 54 dias	- Animais alimentados com dieta baixa em zinco desenvolveram um comportamento tipo-depressivo, que foi prevenido pela administração de desipramina.
Ratos <i>Wistar</i> machos (WATANABE <i>et al.</i> , 2010)	- Dieta adequada (44 mg/kg) ou deficiente (2,7 mg/kg) em zinco por 2 semanas	- Corticosterona sérica foi aumentada após estresse por imersão na água em animais alimentados com dieta deficiente em zinco. - Animais deficientes em zinco tiveram um comportamento tipo-depressivo e um maior aumento de glutamato extracelular hipocampal (após estimulação com cloreto de potássio).
Ratos <i>Wistar</i> machos (CIESLIK <i>et al.</i> , 2011)	- Hidroaspartato de zinco (15 mg/kg, p.o.) - imipramina (5	- Estresse crônico imprevisível diminuiu os níveis de RNAm do BDNF no hipocampo e os níveis séricos de zinco.

	<p>mg/kg, p.o.) ou controle por 16 dias</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estresse crônico imprevisível por 16 dias 	<ul style="list-style-type: none"> - O tratamento com zinco (mas não com imipramina) aumentou os níveis de RNAm do BDNF (no hipocampo) em animais estressados e não estressados. - Associação do zinco com imipramina aumentou os níveis de RNAm do BDNF (no hipocampo) apenas nos animais estressados. - Associação do zinco com imipramina diminuiu o zinco sérico em animais não estressados, mas aumentou nos animais estressados.
<p>Ratos <i>Wistar</i> machos (SOWA-KUCMA <i>et al.</i>, 2011)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hidroaspartato de zinco (10 e 65 mg/kg, i.p.), antidepressivo (citalopram ou imipramina) ou controle por 14 dias 	<ul style="list-style-type: none"> - Administração de zinco (10 e 65 mg/kg) ou citalopram aumentou o pool de zinco pré-sináptico no córtex pré-frontal. - Administração de zinco (65 mg/kg), citalopram ou imipramina aumentou zinco extracelular no córtex pré-frontal. - Apenas administração de zinco (65 mg/kg) aumentou o zinco pré-sináptico e extracelular no hipocampo.
<p>Camundongos albinos de ambos os sexos (JOSHI <i>et al.</i>, 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ZnCl₂ (10, 15 e 20 mg/kg, i.p.) ou controle por 7 dias 	<ul style="list-style-type: none"> - Zinco induziu um comportamento tipo-antidepressivo nas doses de 15 e 20 mg/kg. - Dose subativa (10 mg/kg) teve efeito sinérgico com antidepressivo.
<p>Camundongos CD1 machos (MLYNIEC e NOWAK, 2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Deita adequada em zinco (33,5 mg/kg) ou deficiente em zinco (0,2 	<ul style="list-style-type: none"> - Animais alimentados com dieta deficiente em zinco por 2 semanas tiveram um comportamento tipo-antidepressivo, mas 4 ou 10

	mg/kg) por 2, 3, 4 ou 10 semanas - Imipramina, escitalopram ou controle	semanas de dieta promoveram um efeito tipo-depressivo. - Antidepressivos tiveram seus efeitos prejudicados em animais alimentados por 3 semanas com dieta deficiente em zinco.
Ratos <i>Wistar</i> machos (TAKEDA, 2012)	- Administração de clioquinol (30 mg/kg, i.p.) – quelante do zinco permeável à membrana ou controle - Estresse de suspensão pela cauda por 30 segundos	- Zinco influenciou na atenuação da potenciação de longa duração no hipocampo após exposição ao estresse. - O tratamento de fatias hipocámpais com corticosterona aumentou o zinco extracelular e intracelular e o cálcio intracelular.
Camundongos CD1 machos (MLYNIEC <i>et al.</i> , 2013a)	- Dieta adequada em zinco (33,5 mg/kg) ou deficiente em zinco (0,2 mg/kg) por 6 semanas	- Animais alimentados com dieta deficiente em zinco não responderam de maneira adequada aos antidepressivos. - Animais alimentados com dieta deficiente em zinco tiveram menos zinco sérico, sendo este efeito revertido pelo tratamento com antidepressivo.
Camundongos CD1 machos (MLYNIEC <i>et al.</i> , 2013b)	- Dieta adequada em zinco (33,5 mg/kg) ou deficiente em zinco (0,2 mg/kg) por 6 semanas	- Animais alimentados com dieta deficiente em zinco tiveram um comportamento tipo-depressivo. - Animais alimentados com dieta deficiente em zinco tiveram uma redução na expressão das proteínas GPR39 e BDNF no córtex pré-frontal.
Camundongos CD1 machos (MLYNIEC e NOWAK, 2013)	- Administração de escitalopram, reboxetina, bupropiona e imipramina.	- Escitalopram, reboxetina, bupropiona, mas não imipramina, aumentou a expressão do receptor de zinco GPR39 no córtex pré-frontal.

<p>Ratos <i>Wistar</i> machos (SAMARDZIC <i>et al.</i>, 2013)</p>	<p>- Zinco histidina (10, 20 ou 30 mg/kg, i.p.)</p>	<p>- Administração aguda de zinco agudo teve efeito tipo-antidepressivo nas doses de 10 e 30 mg/kg.</p>
<p>Ratos <i>Sprague Dawley</i> machos (DOBOSZEWSKA <i>et al.</i>, 2014)</p>	<p>- Dieta adequada em zinco (50 mg/kg) ou dieta deficiente em zinco (3 mg/kg) por 4 ou 6 semanas</p>	<p>- 4 e 6 semanas de dieta deficiente em zinco propiciou um comportamento tipo-depressivo, anedônico e reduziu o comportamento social. - 4 e 6 semanas de dieta deficiente em zinco aumentou a expressão das subunidades do receptor de glutamato (GluN2A e GluN2B) e diminuiu a expressão da PSD-95, CREB e BDNF no hipocampo. Houve aumento da expressão do GluN2A no córtex pré-frontal, apenas após 6 semanas de dieta deficiente de zinco.</p>
<p>Camundongos CD1 machos Ratos <i>Sprague Dawley</i> machos (MLYNIEC <i>et al.</i>, 2014)</p>	<p>- Dieta adequada em zinco (33,5 mg/kg para camundongo ou 50 mg/kg para ratos) ou deficiente em zinco (0,2 mg/kg para camundongos ou 3 mg/kg para ratos) por 6 semanas</p>	<p>- Camundongos e ratos alimentados com dieta deficiente em zinco tiveram diminuição na expressão do GPR39 no hipocampo e córtex frontal. - Camundongos alimentados com dieta deficiente em zinco tiveram diminuição na expressão do CREB, BDNF e TrkB no hipocampo.</p>
<p>Ratos <i>Sprague Dawley</i> machos (DOBOSZEWSKA <i>et al.</i>, 2015)</p>	<p>- Dieta adequada em zinco (50 mg/kg) ou dieta deficiente em zinco (3 mg/kg) por 6 semanas. - Últimas duas</p>	<p>- Ratos alimentados com dieta deficiente de zinco tiveram um comportamento tipo-depressivo. Esse comportamento foi revertido pela administração de fluoxetina.</p>

	<p>semanas, os animais receberam fluoxetina ou controle.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dieta deficiente de zinco diminuiu os níveis de BDNF e a fosforilação do CREB no hipocampo. - Dieta deficiente de zinco aumentou subunidades do receptor NMDA GluN1, GluN2A e GluN2B no hipocampo.
<p>Camundongos <i>knockout</i> para GPR39 (MLYNIEC, GAWEL e NOWAK, 2015)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Tratamento crônico (14 dias) com reboxetina, escitalopram, imipramina e MK-801. - Tratamento agudo com imipramina, MK-801 ou cetamina. 	<ul style="list-style-type: none"> - Animais sem receptor para zinco não responderam ao tratamento com reboxetina, escitalopram e imipramina e nem ao tratamento agudo com imipramina. - O efeito tipo-antidepressivo exercido pelo MK-801 e cetamina não foi alterado pela falta do receptor GPR39.
<p>Camundongos <i>Swiss</i> CD1 machos (MLYNIEC e NOWAK, 2015)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dieta deficiente em zinco (0,2 mg/kg) por 6 semanas. - Antidepressivos (imipramina, escitalopram, reboxetina, bupropiona) administrados agudamente ou por 2 semanas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Antidepressivos administrados agudamente (em animais com dieta deficiente em zinco) diminuíram a expressão (córtex pré-frontal) do GPR39, CREB, BDNF (exceto para reboxetina e bupropiona) e TrkB (exceto para bupropiona). - Antidepressivos administrados cronicamente (em animais com dieta deficiente em zinco) aumentaram a expressão do GPR39, CREB (exceto para imipramina), BDNF e TrkB.
<p>Camundongos <i>knockout</i> para GPR39 Camundongos CD1 machos (MLYNIEC <i>et al.</i>, 2015a)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Animais <i>knockout</i>: avaliação do modelo. - Camundongos CD1: alimentados com 	<ul style="list-style-type: none"> - Animais sem o receptor GPR39 tiveram um comportamento tipo-depressivo. - Animais sem o receptor GPR39 tinham níveis diminuídos de CREB e BDNF

	dieta deficiente (02 mg/kg) ou adequada (3,5 mg/kg) em zinco	no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal. - Animais alimentados com dieta deficiente em zinco tinham maiores níveis séricos de corticosterona e menores níveis de receptor de glicocorticoide no hipocampo e córtex pré-frontal.
Ratos <i>Sprague Dowley</i> machos (SZEWCZYK <i>et al.</i> , 2015)	- Hidroaspartato de zinco (5 mg/kg, i.p.) agudo (administrado em diferentes momentos). - Inibidores de vias de sinalização da mTOR.	- Zinco administrado 30 min e 3 h antes do teste exerceu efeito tipo-antidepressivo. Mas isso não ocorreu quando o zinco foi administrado 24 h antes do teste. - Zinco administrado 30 min e 3 h antes da decapitação aumentou a fosforilação da mTOR e da p70S6K no córtex pré-frontal (em fração enriquecida com sinaptossomo). 24 h antes da decapitação não teve alteração. - Zinco administrado 3 h antes da decapitação aumentou a expressão de proteínas sinápticas (BDNF, GluA1 e sinapsina 1). 24 h antes aumentou a expressão do BDNF e do GluA1. 30 min antes não teve nenhuma alteração. - Administração de inibidores de vias da mTOR (antagonista da mTOR e inibidores da PI3K, PKA e PKC) impediu o efeito tipo-antidepressivo do zinco.
Camundongos <i>Swiss</i> albino machos	- Dexametasona administrada aguda ou	- Dose alta (64 mcg/kg) de dexametasona administrada agudamente e dose baixa (16

<p>(WROBEL <i>et al.</i>, 2015)</p>	<p>cronicamente (14 dias).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hidroaspartato de zinco (5, 10, 15 ou 30 mg/kg, i.p.) administrado em 3 doses (24, 5 e 1h antes do teste) ou por 14 dias. - Imipramina ou cetamina (administradas i.p. em doses ativas ou subefetivas) administrada 1h30min antes do teste ou por 14 dias (apenas para imipramina). 	<p>mcg/kg) administrada por 14 dias causou comportamento tipo-depressivo.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Administração aguda ou subcrônica (de doses ativas) de zinco, imipramina e cetamina, bem como a combinação entre eles (de doses subativas) reverteu o efeito da dexametasona administrada por 14 dias. - Associação de doses subativas de zinco com imipramina por 14 dias impediu o efeito tipo-depressivo exercido pelo dexametasona.
<p>Camundongos ICR machos (DING <i>et al.</i>, 2016)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sulfato de zinco (15 ou 30 mg/kg, i.p.) ou imipramina (5 ou 20 mg/kg, i.p.) ou controle por 3 semanas (após o término do protocolo de estresse) - Estresse de contenção crônico por 3 semanas 	<ul style="list-style-type: none"> - Animais submetidos ao estresse tinham comportamento tipo-depressivo. Isso foi revertido pelo tratamento com zinco (apenas na dose 30 mg/kg) ou imipramina (apenas na dose de 20 mg) ou pela associação de doses subefetivas de zinco (15 mg/kg) e imipramina (5 mg/kg). - Animais submetidos ao estresse tinham menores níveis de zinco sérico. Isso foi pelo tratamento com zinco (15 ou 30 mg/kg) ou imipramina (apenas na dose de 20 mg). - Animais submetidos ao estresse tinham maiores níveis

		<p>de zinco hipocampal. Isso foi revertido pelo tratamento com zinco (apenas na dose 30 mg/kg) ou imipramina (apenas na dose de 20 mg) ou pela associação de doses subefetivas de zinco (15 mg/kg) e imipramina (5 mg/kg).</p> <p>- Animais submetidos ao estresse tinham uma menor expressão hipocampal do RNAm do GPR39, BDNF e CREB e uma maior expressão do receptor NMDA. Essas alterações foram revertidas pelo tratamento com zinco (apenas na dose 30 mg/kg) ou imipramina (apenas na dose de 20 mg/kg) ou pela associação de doses subefetivas de zinco (15 mg/kg) e imipramina (5 mg/kg).</p>
<p>Camundongos <i>knockout</i> para GPR39 (MLYNIEC <i>et al.</i>, 2016)</p>	-	<p>- <i>Knockout</i> para GPR39 tinham comportamento tipo-depressivo.</p> <p>- <i>Knockout</i> para GPR39 tinham menor viabilidade celular e proliferação de esplenócitos e uma maior produção de IL-6.</p>

Abreviaturas: BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc; ERK, proteína cinase regulada por sinal extracelular; GABA, ácido gama aminobutírico; mTOR, proteína alvo da rapamicina em mamíferos; NMDA, N-metil-D-aspartato; PI3K, fosfatidilinositol 3 cinase; PKA, proteína cinase A; PKC, proteína cinase C; TrkB, receptor tropomiosina cinase B. Fonte: próprio autor.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00795

Título

Metodologias utilizadas no laboratório de Neurobiologia da Depressão para ensaios in vivo.

Data de Entrada

17/05/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

26/07/2012

Considerações

Ofício nº 62/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues, Departamento de Bioquímica - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade o presidente da CEUA-UFSC deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no protocolo e corrigidos na carta anexa estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: sete mil camundongos (*Mus musculus*) e duzentos e cinquenta ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 26/10/2016**

Data 26/07/2012

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE