

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências**

Luis Eduardo Beltrão Bettio

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA E DA VIA L-
ARGININA-ÓXIDO NÍTRICO-GMP_c NO EFEITO TIPO-
ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA**

**Florianópolis
Março/2012**

Luis Eduardo Beltrão Bettio

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA E DA VIA L-ARGININA ÓXIDO
NÍTRICO NO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

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

**Florianópolis
2012**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

B565e Bettio, Luis Eduardo Beltrão
Envolvimento dos receptores NMDA e da via L-arginina-óxido
nítrico-GMPc no efeito tipo-antidepressivo da guanosina
[dissertação] / Luis Eduardo Beltrão Bettio ; orientadora,
Ana Lúcia Severo Rodrigues. - Florianópolis, SC, 2012.
100 p.: grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Antidepressivos. I. Rodrigues, Ana
Lúcia Severo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

CDU 612.82

“O que é real? Como você define o 'real'? Se você está falando sobre o que você pode sentir, o que você pode cheirar, o que você pode saborear e ver, o real são simplesmente sinais elétricos interpretados pelo seu cérebro.”

(Matrix)

Gostaria de agradecer...

À minha família por, mesmo sem entender direito o que eu faço da vida, me apoiar e se orgulhar. Pelo suporte material e psicológico, pela paciência eterna e por acreditar em mim.

Aos que participaram diretamente do projeto: Maurício (pelos questionamentos e debates científicos), à Josi (pela paciência e disponibilidade sempre que eu pedi socorro), ao Colla (pelos zilhões de chá verdes pra esfriar a cabeça), ao Francis e à Ágatha (por fazerem questão de ajudar sempre e pelas risadas).

Não posso deixar de agradecer também aos colegas de laboratório que não participaram diretamente do projeto mas que sempre estiveram presentes da mesma forma com inúmeras conversas e discussões muito cafeinadas: Andiara, Morgana, Luana, Vivi, Dani, Júlia e Juliana. Da mesma forma os que já fizeram parte do laboratório e contribuíram para minha formação na pesquisa: Pati, Rica, Kelly, Manu, Daniel, Grazi, Juliano, Chandra, Roberto.

À Professora Ana Lúcia pela orientação no trabalho e pela confiança depositada. Pelo apoio e paciência sempre, aceitando as diferenças individuais de cada aluno e nos ensinando a persistir.

Aos demais Professores da Pós pelos conhecimentos passados e discussões nas disciplinas e também aos alunos, pelas cervejas e risadas.

Aos amigos que não tem qualquer espécie de envolvimento com meu trabalho e que possivelmente não vão ler isso, mas que estiveram sempre do meu lado nos momentos de descontração. Não tenho como citar a todos mas sei que existe uma obrigação moral de mencionar o Rade, Igor, Mari, Panthera e Christiano.

À Zucco, por se recusar a sair da minha vida depois do fim do namoro e fazer com que onde na maioria dos casos fica rancor, exista uma amizade, consideração e admiração mútua intermináveis.

Aos animais experimentais, por possibilitarem a ampliação do conhecimento e a resolução de inúmeros problemas que causam transtorno à humanidade.

Aos animais de estimação aqui de casa também, pelo apoio silencioso, sempre sentadinhos ao lado fazendo companhia desde os primeiros seminários preparados até o momento em que escrevo essas linhas.

Também queria agradecer ao Nivaldo, como acredito que todo aluno que defende na Neurociências faz, por estar sempre disposto a ajudar a resolver qualquer problema que apareça.

À Capes, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A guanosina é um nucleosídeo endógeno que modula a captação de glutamato pelos astrócitos, controlando os níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica. Além disso, exerce uma série de efeitos tróficos sobre os neurônios e estimula a proliferação dos astrócitos. O envolvimento do sistema glutamatérgico na patofisiologia da depressão tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos. Os dados encontrados na investigação desse sistema sugerem que o efeito tardio dos antidepressivos convencionais está relacionado com a ocorrência de uma série de alterações neuroquímicas e estruturais durante o período em que os fármacos ainda não apresentam efeito terapêutico. Entre essas alterações está a redução na atividade dos receptores NMDA e uma consequente ativação de vias de sinalização intracelular relacionadas à inibição desses receptores. A administração de certos antagonistas desses receptores exerce uma ação antidepressiva rápida e duradoura com dose única, confirmando o potencial desse sistema para uma nova abordagem no tratamento da depressão. Entretanto, apesar do papel da guanosina na modulação do sistema glutamatérgico e do envolvimento desse sistema na patofisiologia da depressão, ainda não existem estudos investigando o potencial antidepressivo desse nucleosídeo. Sendo assim, o presente trabalho investigou o potencial antidepressivo da guanosina em camundongos, utilizando os dois modelos preditivos mais utilizados para avaliação de atividade antidepressiva, o teste do nado forçado (TNF) e o teste de suspensão pela cauda (TSC). Os animais foram submetidos também ao teste do campo aberto (TCA) para descartar a possibilidade de o efeito encontrado estar relacionado a alterações na atividade locomotora. A administração aguda de guanosina produziu um efeito antidepressivo no TNF (0,5-5 mg/kg, p.o.) e no TSC (0,05-0,5 mg/kg, p.o.) sem alterar a atividade locomotora no TCA. Para avaliar o mecanismo de ação envolvido no efeito encontrado, foram investigadas a participação dos receptores NMDA, da via L-arginina-NO-GMPc e de vias de sinalização intracelular relacionadas à atividade dos receptores NMDA. O efeito antidepressivo da guanosina no TSC foi prevenido pelo tratamento dos animais com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.), D-serina (30 µg/sítio, i.c.v.), L-arginina (750 mg/kg, i.p.), sildenafil (5 mg/kg, i.p.), LY294002 (10 µg/sítio, i.c.v.), wortmanina (0,1 µg/sítio, i.c.v.) e rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.). Além disso, a administração de dose sub-ativa de guanosina (0,01 mg/kg, p.o.) produziu um efeito

antidepressivo no TSC quando combinada com doses sub-ativas de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.), MK-801 (0.001 mg/kg, p.o.), 7-nitroindazol (50 mg/kg, i.p.) ou ODQ (30 pmol/sítio i.c.v.). Nenhum dos tratamentos afetou significativamente a atividade locomotora dos animais. Os resultados sugerem que a administração aguda de guanosina produz um efeito antidepressivo em camundongos submetidos ao TNF e ao TSC que parece ser mediado por uma inibição dos receptores NMDA e da síntese de NO e GMPc. Também foi constatado o envolvimento das vias de sinalização da PI3K e da mTOR nesse efeito.

Palavras-chave: guanosina, antidepressivo, NMDA, NO, GMPc, PI3K, mTOR.

ABSTRACT

Guanosine is an endogenous nucleoside that modulates glutamate uptake by astrocytes, controlling the levels of this neurotransmitter in the synaptic cleft. In addition, it also exerts trophic effects on neurons and stimulates the proliferation of astrocytes. The involvement of the glutamatergic system in the pathophysiology of depression has been extensively investigated in recent years. It has been reported that the late effect of conventional antidepressants is associated with the occurrence of neurochemical and structural changes during the period in which the drugs have not yet produced therapeutic effects. Among these changes a reduction in NMDA receptor activity with the consequent activation of intracellular signaling pathways related to the inhibition of these receptors are reported. The administration of single doses of certain NMDA receptor antagonists exerts a rapid and lasting antidepressant action, suggesting the potential of this approach for the treatment of depression. However, despite the role of guanosine in the modulation of glutamatergic system and the involvement of this system in the pathophysiology of depression, there are no studies investigating the antidepressant activity of this nucleoside. Therefore, this study investigated the antidepressant potential of guanosine in mice using two of the most widely used predictive animal models to evaluate antidepressant activity, the forced swimming test and the tail suspension test (TST). Animals were also submitted to the open-field test to rule out the possibility that the effect found in the TST is related to alterations in locomotor activity. Acute administration of guanosine produced an antidepressant-like effect in the FST (0.5-5 mg/kg, p.o.) and in the TST (0.05-0.5 mg/kg, p.o.), without changing locomotor activity in the open-field test. To evaluate the mechanism of action involved in the effect found, we investigated the involvement of NMDA receptors, the L-arginine-NO-cGMP pathway and intracellular signaling pathways related to the activity of NMDA receptors. The antidepressant-like effect of guanosine in the TST was prevented by the treatment of animals with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.), D-serine (30 µg/site, i.c.v.), L-arginine (750 mg/kg, i.p.), sildenafil (5 mg/kg, i.p.), LY294002 (10 µg/site, i.c.v.), wortmannin (0.1 µg/site, i.c.v.) and rapamycin (0.2 nmol/site, i.c.v.). Moreover, the administration of sub-active dose of guanosine (0.01 mg/kg, p.o.) elicited an antidepressant-like effect in the TST when combined with sub-active doses of ketamine (0.1 mg/kg, i.p.), MK-801

(0.001 mg/kg, p.o.), 7-nitroindazol (50 mg/kg, i.p.) or ODQ (30 pmol/site, i.c.v.). None of the treatments significantly affected the locomotor activity of animals. The results suggest that acute administration of guanosine produces an antidepressant-like effect in mice submitted to the FST and the TST that seems to be mediated by an interaction with NMDA receptors and the inhibition of NO and cGMP synthesis. Our study also found an involvement of PI3K and mTOR signaling pathways in this effect.

Keywords: guanosine, antidepressant, NMDA, NO, cGMP, PI3K, mTOR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático das fontes de derivados da adenina e da guanina.....	23
Figura 2. Receptores do sistema purinérgico.....	25
Figura 3. Mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo de antagonistas de receptores NMDA.....	37
Figura 4. Síntese e alvos do óxido nítrico.....	39
Figura 5. Teste do nado forçado.....	44
Figura 6. Teste de suspensão pela cauda.....	44
Figura 7. Teste do campo aberto.....	45
Figura 8. Efeito da administração aguda de guanosina no TNF, no TSC e no TCA.....	49
Figura 9. Efeito do tratamento com NMDA na redução do tempo de imobilidade causada pela guanosina no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	50
Figura 10. Efeito do tratamento dos animais com D-serina sobre a redução do tempo de imobilidade ocasionada pela administração de guanosina no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	51
Figura 11. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de MK-801 e guanosina no tempo de imobilidade dos animais no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	52
Figura 12. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de guanosina e cetamina no tempo de imobilidade dos animais no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	53
Figura 13. Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela administração de guanosina no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	54
Figura 14. Efeito do co-tratamento com doses sub-ativas de guanosina e 7-NI no tempo de imobilidade dos animais no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	55

Figura 15. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de guanosina e ODQ no tempo de imobilidade dos animais no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	56
Figura 16. Efeito do pré-tratamento dos animais com sildenafil sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela administração de guanosina no TSC e sobre a atividade locomotora no TCA.....	57
Figura 17. Efeito do tratamento dos animais com wortmanina sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela administração de guanosina no TSC e sobre a atividade locomotora no TCA.....	58
Figura 18. Efeito do tratamento dos animais com LY294002 sobre a redução do tempo de imobilidade ocasionada pela administração de guanosina no TSC e sobre a atividade locomotora no TCA.....	59
Figura 19. Efeito do tratamento dos animais com rapamicina sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela administração de guanosina no TSC e na atividade locomotora no TCA.....	60
Figura 20. Possíveis mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo da administração aguda de guanosina no TSC.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sintomas da depressão.....	30
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-NI - 7-nitroindazol
ADP - adenosina 5' - difosfato
AMP - adenosina 5' - monofosfato
AMPA - ácido α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc - adenosina 5' - monofosfato cíclico
ANOVA - análise de variância
ATP - adenosina 5' - trifosfato
BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro
CREB - elemento de ligação de resposta ao AMP cíclico
DA - derivados da adenina
DG - derivados da guanina
DMSO - dimetilsulfóxido
eNOS - óxido nítrico sintase endotelial
ERK - proteína cinase regulada por sinal extracelular
FGF-2 - fator de crescimento de fibroblastos básico
GABA - ácido gama aminobutírico
GCs - guanilato ciclase solúvel
GDP - guanosina 5'-difosfato
GMP - guanosina 5'-monofosfato
GMPc - guanosina 5'-monofosfato cíclico
GTP - guanosina 5'-trifosfato
HPA - hipotálamo-hipófise-adrenal
i.c.v. - intracerebroventricular
MAO - inibidor da monoamina oxidase
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
ISRN - inibidor seletivo da recaptação de noradrenalina
ISRS - inibidor seletivo da recaptação de serotonina
IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
i.p. - intraperitoneal
LY294002 - 2-4(-morfolinil)-8-fenil-1-(4H)-benzopiran-4-1-hidroclorato
MAPK - proteína cinase ativada por mitógeno
MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridinium
mTOR - proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NGF - fator de crescimento do nervo
NMDA - N-metil-D-aspartato
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintase
ODQ - 1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona]
PDE - fosfodiesterase
PI3K - fosfatidilinositol 3'-cinase
PKG - proteína quinase dependente de GMPc
p.o. - per os
PSD-95 - proteína de densidade pós-sináptica de 95kDa
S6K - proteína ribossomal S6 cinase
SNC - sistema nervoso central
TCA - teste do campo aberto
TNF - teste do nado forçado
TSC - teste de suspensão pela cauda
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. SISTEMA PURINÉRGICO.....	23
1.1.1. As Purinas.....	23
1.1.2. Receptores Purinérgicos.....	24
1.1.3. Derivados da Guanina.....	25
1.1.4. A Guanosina.....	26
1.2. DEPRESSÃO.....	29
1.2.1. Hipótese Neurotrófica da Depressão.....	32
1.2.2. Sistema Glutamatérgico e Depressão.....	33
1.2.3. Depressão e Óxido Nítrico.....	37
1.2.4. Modelos Animais de Depressão.....	40
2. JUSTIFICATIVA.....	41
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. OBJETIVO GERAL.....	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. ANIMAIS.....	43
4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	43
4.2.1. Teste do Nado Forçado.....	43
4.2.2. Teste de Suspensão pela Cauda.....	44
4.2.3. Teste do Campo Aberto.....	45
4.3. DROGAS E TRATAMENTOS.....	45
4.3.1. Vias de Administração.....	45
4.3.2. Avaliação do efeito antidepressivo da guanosina no TSC e da atividade locomotora no TCA.....	46
4.3.3. Avaliação do mecanismo de ação antidepressiva da guanosina no TSC.....	46
4.3.3.1. Envolvimento dos receptores NMDA.....	46
4.3.3.2. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico.....	47

4.3.3.3. Envolvimento de vias de sinalização intracelular.....	48
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GUANOSINA NO TEMPO DE IMOBILIDADE DOS ANIMAIS NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TCA.....	49
5.2. ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TCA.....	50
5.3. ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA-NO-GMP _c NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TCA.....	53
5.4. ENVOLVIMENTO DA PI3K E DA mTOR NA REDUÇÃO DO TEMPO DE IMOBILIDADE DOS ANIMAIS OCACIONADA PELA GUANOSINA NO TSC E SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TCA.....	57
6. DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÕES.....	70
PERSPECTIVAS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA PURINÉRGICO

1.1.1. As purinas

O sistema purinérgico inclui as purinas derivadas da adenina (os nucleotídeos ATP, ADP, AMP e o nucleosídeo adenosina), as purinas derivadas da guanina (os nucleotídeos GTP, GDP, GMP e o nucleosídeo guanosina), além dos metabólitos xantina, hipoxantina, ácido úrico e o nucleosídeo inosina, bem como receptores, transportadores e enzimas. A adenosina e a guanosina são formadas a partir da hidrólise de nucleotídeos mediante a atividade da enzima ecto-5'-nucleotidase (Schmidt et al., 2007).

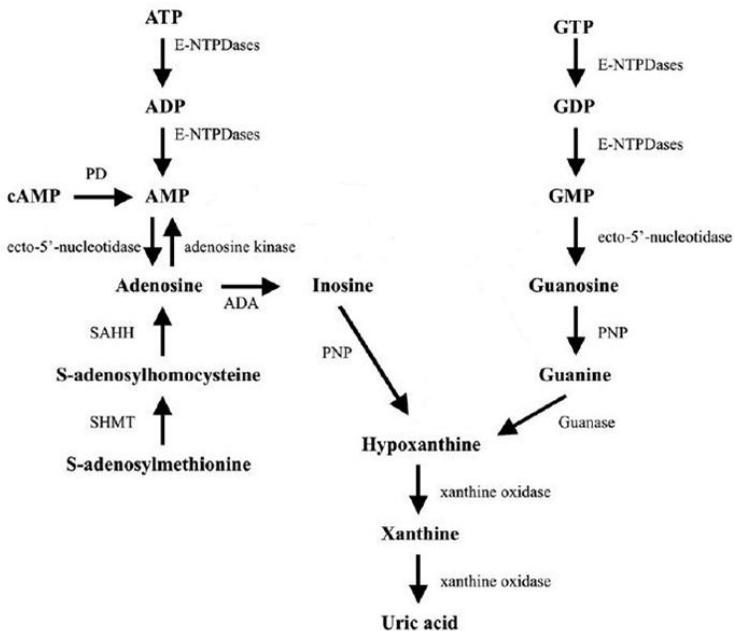


Figura 1. Modelo esquemático das fontes de derivados da adenina e da guanina. E-NTPDases, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase; ADA, adenosina deaminase; SHMT, serina hidroximetiltransferase; SAHH, S-

adenosil-homocisteína hidrolase; PD, ectofosfodiesterase; PNP, purina nucleosídeo fosforilase (Adaptado de Schmidt et al., 2007).

A nível intracelular, o sistema purinérgico exerce influência no metabolismo energético, síntese de ácidos nucléicos e colesterol assim como na ativação de uma variedade de receptores de membrana (Abbracchio e Burnstock, 1998; Schmidt et al., 2007). Uma vez no meio extracelular, as purinas são reconhecidas como moléculas sinalizadoras de efeitos tróficos, influenciando o crescimento, diferenciação e morte celular (Rathbone et al., 1992, 1998). Além disso, as purinas desempenham também um papel importante durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Zimmermann, 2011) e na fisiopatologia de numerosas enfermidades crônicas e agudas do mesmo (Cicarrelli et al., 2001).

A principal fonte de purinas no SNC são os astrócitos sendo que, em condições patológicas estas células aumentam expressivamente a liberação tanto de derivados da adenina (DA) quanto de derivados da guanina (DG) (Ciccarelli et al., 1999).

1.1.2. Receptores purinérgicos

Os principais agonistas endógenos do sistema purinérgico são a adenosina e o ATP. Os receptores purinérgicos são divididos em dois grupos, sendo eles os do tipo P1 (subtipos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) tendo a adenosina como principal ligante, e do tipo P2 (subtipos P2Xs e P2Ys), que tem o ATP como principal ligante (Stone, 1991). Os P2Xs são formados por receptores ionotrópicos e abrangem 8 sub-tipos enquanto os P2Ys são receptores acoplados à proteína G e possuem 7 sub-tipos reconhecidos. Esses receptores são amplamente distribuídos no SNC assim como em outros órgãos. (Burnstock et al., 2011)

Os DG por sua vez, ligam-se a receptores de purinas da adenina com baixa afinidade (Muller e Scior, 1993). Entretanto, evidências experimentais demonstram que o GTP liga-se a sítios específicos em células de feocromocitoma (PC12) (Gysbers et al., 2000) e em membranas cerebelares de pintos (Tasca et al., 1999), sugerindo que as purinas derivadas da guanina possuem alvos celulares distintos das purinas derivadas da adenina.

Reforçando essa idéia, estudos identificaram e caracterizaram farmacologicamente sítios específicos de união para a guanosina em preparações de membrana de cérebro de ratos (Traversa et al., 2002),

em cultura de astrócitos (Chen et al., 1993) e em células PC12 (Bau et al., 2005). Recentemente dados experimentais demonstraram evidências para a existência de receptores metabotrópicos específicos ativados pela guanosina que diferem dos já bem caracterizados receptores adenosinérgicos (Volpini et al., 2011). Entretanto, nenhum alvo foi clonado e teve sua sequência caracterizada ainda.

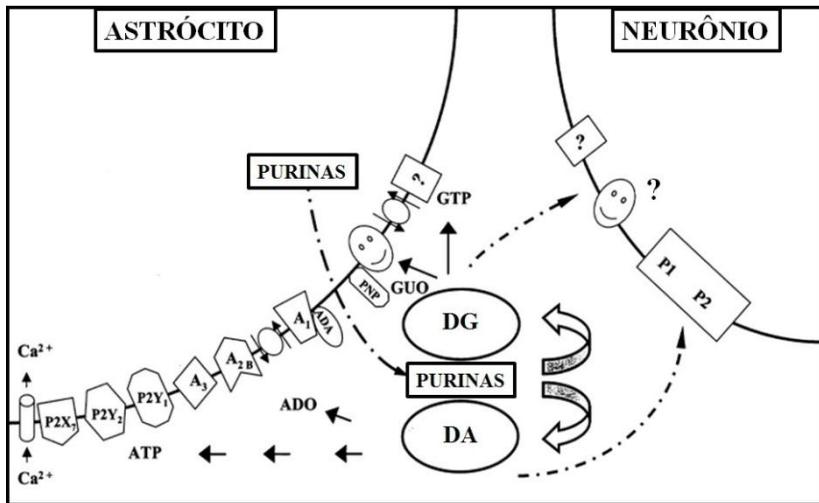


Figura 2. Receptores do sistema purinérgico. Representação esquemática dos receptores do sistema purinérgico em astrócitos e neurônios. Os derivados da adenina (DA) ligam-se aos receptores do tipo P1 (subtipos A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3) e do tipo P2 (subtipos P2Ys e P2Xs), tendo a adenosina e o ATP como principais ligantes respectivamente. Os receptores dos derivados da guanina (DG), marcados com '?', ainda estão sendo caracterizados. Uma vez liberadas pelos astrócitos, as purinas interagem com seus respectivos receptores nos astrócitos ou neurônios, exercendo seus efeitos tróficos (Adaptado de Cicarelli et al., 2001).

1.1.3. Derivados da Guanina

O papel extracelular dos nucleosídeos e nucleotídeos purínicos já foi alvo de diversos estudos que comprovaram seus efeitos sobre a célula, influenciando o crescimento, divisão e proliferação celular (Neary et al., 1996, Schmidt et al., 2007). Apesar de a adenosina e o ATP serem considerados os principais efetores do sistema purinérgico (Ralevic e Burnstock, 1998), diversos estudos têm se focado na investigação do papel dos DG. Estes podem atuar como

neurotransmissores ou neuromoduladores tanto no SNC, quanto periféricamente (Neary et al., 1996, Rathbone et al., 1999).

Ao nível intracelular, os DG tem um papel regulatório na função celular modulando a atividade da proteína G (Gudermann et al., 1997), a qual participa da transdução de sinal no SNC, associada a uma grande diversidade de receptores, incluindo os glutamatérgicos (Ozawa, et al., 1998). Os DG também estão envolvidos na síntese de proteínas, na sinalização transmembrana, translocação de proteínas no retículo endoplasmático, controle do movimento vesicular nas células, diferenciação e proliferação celular (Bourne et al., 1990).

Extracelularmente, os DG exercem diversos efeitos sobre a atividade do sistema glutamatérgico como a inibição do binding de glutamato (Paas et al., 1996) e da toxicidade induzida pela hiperativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Schmidt et al., 2005). Além disso, os DG apresentam efeitos tróficos e mitóticos sobre as células neurais e gliais e influenciam aspectos comportamentais como a memória e o aprendizado (Schmidt et al., 2007).

As concentrações extracelulares de DG são dependentes de um balanço entre sua liberação, captação e metabolismo. A liberação de DG pode ocorrer tanto através dos neurônios como de células da glia sendo que, em situações de insulto, esta liberação é três vezes maior do que a dos DA. (Ciccarelli et al., 1999). Evidências indiretas indicam que o nucleosídeo guanosina, assim como a adenosina, pode ser liberada dos neurônios após a ocorrência da despolarização (Fredholm e Vernet, 1979). Além disso, foi observado que o GTP pode ser estocado em vesículas sinápticas (Santos et al., 2006).

1.1.4. A Guanosina

A guanosina é um nucleosídeo endógeno extensivamente presente no SNC, sendo derivada do metabolismo dos nucleotídeos da guanina (Schmidt et al., 2007). A principal fonte de guanosina é sua liberação pelos astrócitos e ocorre em condições fisiológicas, entretanto, em situações isquêmicas ocorre um aumento na concentração do nucleosídeo de aproximadamente quatro vezes (Ciccarelli et al., 2001). Esse aumento permanece por um período de tempo elevado sendo que, *in vivo*, observou-se um aumento de 140% durante mais de uma semana após o insulto (Uemura et al., 1991). Esses dados sugerem que possivelmente a guanosina seja um componente neuroprotetor endógeno liberado em situações excitotóxicas.

De fato um dos efeitos mais bem estabelecidos da guanosina é sua capacidade de modular o sistema glutamatérgico (Frizzo et al., 2005). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos (McEntee e Crook, 1993). Após a sua liberação na fenda sináptica, são necessários mecanismos de remoção rápida e eficiente deste neurotransmissor (Danbolt, 2001). Esse controle ocorre através de transportadores localizados na membrana de astrócitos e neurônios e é essencial para impedir que níveis excessivos de glutamato causem morte neuronal por excitotoxicidade (Meldrum, 2000). Esse tipo de toxicidade está envolvido na patogênese de diversas doenças agudas ou crônicas do SNC (Segovia et al., 2001), reforçando a importância do balanço entre os níveis fisiológico e patológico de glutamato.

A guanosina modula o sistema glutamatérgico estimulando a captação de glutamato pelos astrócitos (Frizzo et al., 2002, 2003, 2005) sendo que, diversas evidências demonstram atividade neuroprotetora do nucleosídeo contra a estimulação excessiva do sistema glutamatérgico (Schmidt et al., 2005; Lara et al., 2001; Vinadé et al., 2003, 2004; Soares et al., 2004; Molz et al., 2011).

Além disso, foram observados uma série de outros efeitos da guanosina como a estimulação da proliferação dos astrócitos e da liberação de adenosina pelos mesmos (Rathbone et al., 1999; Ciccarelli et al., 2000), assim como a síntese e liberação de fatores tróficos por essas células incluindo o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator de crescimento de fibroblastos básico (FGF-2) (Rathbone et al., 1999; Caciagli et al., 2000; Di Iorio et al., 2001). A guanosina age em sinergismo com o NGF, aumentando significativamente a neuritogênese em células PC12, o que sugere um mecanismo diferenciado porém complementar a essa neurotrofina (Gysbers & Rathbone, 1996). Foram constatados também efeitos deste nucleosídeo sobre a diferenciação celular, estimulando a formação de progenitores em neurônios dopaminérgicos em um modelo da doença de Parkinson (Su et al., 2009).

Essas características da guanosina incentivaram uma série de estudos investigando seu potencial regenerativo. Os resultados demonstraram que a guanosina estimula a cicatrização de ferimentos através de um mecanismo dependente de NGF (Jiang et al., 2006), assim como possui efeito remielinizante (Jiang et al., 2003). Estes dados, associados com os efeitos antiapoptóticos e anti-inflamatórios deste nucleosídeo o tornam um alvo terapêutico em potencial para a recuperação de lesões na medula espinhal (Jiang et al., 2007, 2008).

Os efeitos neuroprotetores da guanosina têm sido demonstrados em estudos *in vivo* e *in vitro* contra uma série de insultos. O nucleosídeo se mostrou efetivo em proteger células contra a toxicidade induzida por oligômeros do peptídeo β -amilóide (Tarozzi et al., 2010), estaurosporina (Di Iorio et al., 2004), citocinas pró-inflamatórias (D'Alimonte et al., 2007) e MPP+ (Pettifer et al., 2007). Além disso, constatou-se que os mecanismos de sinalização intracelular pelos quais a guanosina exerce efeito neuroprotetor envolvem a modulação das vias da fosfatidilinositol 3'-cinase/Akt (PI3K/Akt) e/ou das vias de proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs) como as ERK1/2 e a p38 (Di Iorio et al., 2004; D'Alimonte et al., 2007; Tarozzi et al., 2010; Dal-Cim et al., 2011).

A guanosina, quando administrada por via oral, tem sua concentração aumentada expressivamente no SNC, comprovando que esse nucleosídeo atravessa a barreira hemato-encefálica (Vinadé et al., 2005). O transporte de nucleosídeos após administração periférica pode ocorrer nas células intestinais (Ngo et al., 2001) assim como na barreira hemato-encefálica, onde ocorre através de carreadores em microvasos sanguíneos cerebrais (Price, 1999). A administração por via intraperitoneal demonstrou que a guanosina atinge rapidamente todos os tecidos, com sua concentração atingindo um pico após 15 min, exceto no tecido adiposo e SNC onde continua a aumentar durante 30 min (Jiang et al., 2008).

Em modelos comportamentais, a guanosina demonstra atividade anticonvulsivante e ansiolítica sem alterar o peso corporal ou o consumo de água e comida dos animais. Entretanto, assim como ocorre com a adenosina, a guanosina também apresenta efeito amnésico no modelo da esQUIVA inibitória em ratos e camundongos (Vinadé et al., 2003).

Estes efeitos encontrados em modelos comportamentais estão relacionados, possivelmente, à capacidade da guanosina de modular o sistema glutamatérgico, estimulando a captação do neurotransmissor pelos astrócitos (Frizzo et al., 2005; Vinadé et al., 2005). Curiosamente, o efeito amnésico encontrado nos estudos com guanosina é característico também de substâncias que agem como antagonistas do sistema glutamatérgico como a cetamina (Izquierdo et al., 1997; Morgan e Curran, 2012).

Apesar da guanosina ter uma ação sobre o sistema adenosinérgico, foi comprovado que os efeitos da guanosina sobre o aprendizado e memória (Roesler et al., 2000; Vinadé et al., 2004), anticonvulsivantes (Lara et al., 2001), neuritogênicos (Gysbers and

Rathbone, 1996), assim como a estimulação da captação do glutamato (Frizzo et al., 2001), não são dependentes dessa interação. Entretanto, o efeito antinociceptivo da guanosina é anulado pela administração de antagonistas adenosinérgicos (Schmidt et al., 2010).

Os nucleotídeos DG possuem atividades similares às observadas nos estudos com a guanosina, entretanto, é possível que muitos dos efeitos desses nucleotídeos estejam relacionados com sua conversão ao nucleosídeo. Os efeitos anticonvulsivantes do GTP e do GDP parecem ser mediados por sua conversão em guanosina, uma vez que análogos pouco hidrolisáveis desses nucleotídeos não foram efetivos em prevenir as convulsões induzidas por ácido quinolínico (Schmidt et al., 2005). Da mesma forma, foi observado que o efeito amnésico do GMP também é dependente da conversão do nucleotídeo em guanosina (Saute et al., 2006). Essa especificidade da guanosina ocorre também na modulação do sistema glutamatérgico, uma vez que o GDP e o GMP não demonstraram um efeito semelhante à guanosina sobre a captação do glutamato (Frizzo et al., 2003). Entretanto, apesar de o tratamento agudo com GMP produzir efeito antidepressivo em um modelo preditivo de atividade antidepressiva (Eckeli et al., 2000), ainda não existem dados disponíveis verificando se este efeito é dependente de sua conversão em guanosina.

1.2. A DEPRESSÃO

Os transtornos de humor estão entre os maiores problemas de saúde pública do mundo (Nestler e Carlezon, 2006). São doenças comuns, severas, crônicas e muitas vezes ameaçadoras de vida. Estas incluem os transtornos unipolares (transtornos depressivos) e os transtornos bipolares (transtorno maníaco-depressivo) (American Psychiatric Association, 1994). Além disso, apresentam co-morbidades como doenças cardiovasculares, neurológicas e câncer (Nestler et al., 2002) sendo que cerca de 15% dos indivíduos com depressão maior cometem suicídio (Musselman et al., 1998).

A depressão é uma doença crônica, heterogênea e recorrente que possui um impacto negativo na saúde e produtividade da população (Baune et al., 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde, esta doença afeta aproximadamente 121 milhões de pessoas e possivelmente seja a segunda maior causa de incapacitação entre adultos até o ano de 2020 (Murray e Lopez, 1997; Skolnick et al., 2009). No Brasil as estimativas sugerem que existam aproximadamente 54 milhões de pessoas que em algum momento de suas vidas desenvolverão algum

tipo de depressão, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas com risco de suicídio (Nardi, 2000).

Entre as causas da depressão o fator hereditário tem uma influência significativa uma vez que, aproximadamente 40-50% do risco de desenvolver o transtorno tem influência genética. O restante dessa porcentagem se divide entre causas ambientais, incluindo traumas de infância, estresse emocional, doença física e até mesmo infecção viral (Berton e Nestler, 2006).

O diagnóstico é baseado na manifestação clínica de um conjunto de sintomas enumerados na **Tabela 1**, que são altamente variáveis e muitas vezes contrastantes. Para o indivíduo preencher os critérios para o diagnóstico de depressão maior, deve apresentar pelo menos um entre os dois primeiros sintomas e mais o número necessário para perfazer um total de cinco entre os sintomas três a nove, com duração mínima de duas semanas (American Psychiatric Association, 1994).

Tabela 1. Sintomas da Depressão

-
- (1) Humor deprimido
 - (2) Anedonia
-
- (3) Perda significativa de peso (quando o paciente não estiver em dieta) ou ganho de peso, ou aumento ou perda de apetite;
 - (4) Insônia ou hipersonia;
 - (5) Agitação ou retardo psicomotor;
 - (6) Fadiga ou falta de energia;
 - (7) Sentimentos de culpa ou desvalia excessivos ou impróprios;
 - (8) Diminuição na capacidade de concentração e pensamento;
 - (9) Pensamentos recorrentes de morte, ideação suicida sem um plano específico, tentativa de suicídio ou plano específico para cometer suicídio.
-

Fonte: Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (American Psychiatric Association, 1994).

A natureza heterogênea da depressão sugere o envolvimento de múltiplas regiões cerebrais na patofisiologia desta doença. Evidências crescentes têm demonstrado que essas regiões podem estar agindo como mediadores dessa diversidade de sintomas. Através de estudos com

neuroimagem observou-se o envolvimento principalmente do hipocampo e do córtex pré-frontal, possivelmente associados às disfunções cognitivas presentes no transtorno. Da mesma forma, os aspectos motivacionais da depressão, como a anedonia, tem sido relacionados a anormalidades no núcleo accumbens, assim como as alterações no sono e apetite ao hipotálamo (Drevets, 2001; Mayberg, 2003).

A depressão está relacionada com a disfunção de vários sistemas de neurotransmissão (Wong e Licinio, 2001). A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento age na modulação dos sistemas monoaminérgicos, uma vez que a hipofunção desses sistemas tem sido associada ao transtorno há muitas décadas. A terapia farmacológica antidepressiva baseada no aumento das monoaminas é utilizada há mais de 50 anos (Hashimoto, 2011), sendo que incluía primeiramente os antidepressivos inibidores da monoamina oxidase (iMAO) (enzima que degrada as monoaminas na fenda sináptica) e os antidepressivos tricíclicos. Posteriormente surgiram antidepressivos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), de noradrenalina (ISRN) ou de recaptção dual (serotonina/noradrenalina), além de antidepressivos atípicos (Morilak e Frazer, 2004).

Os antidepressivos constituem o maior segmento do mercado de fármacos que agem no SNC (aproximadamente 24%) (Schmidt et al., 2008). Entretanto, a ocorrência de um efeito tardio que pode durar semanas ou até mesmo meses no tratamento com esses fármacos sugere que o aumento nos níveis de monoaminas não é o fator responsável *per se* pelo resultado observado na clínica, uma vez que o efeito farmacológico no metabolismo das monoaminas é essencialmente imediato. (Nestler et al., 2002). Esse efeito tardio pode trazer complicações quando se trata de pacientes com ideação suicida assim como afetar a adesão destes ao tratamento (Skolnick et al., 2009).

Além do bem estabelecido papel do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão (Delgado et al., 1993; Cummings, 1993), atualmente tem se investigado o envolvimento de diversos outros sistemas de neurotransmissores na patogênese desta doença, tais como o sistema glutamatérgico (Skolnick, 2009), opióide (Vilpoux et al., 2002; Berrocoso et al., 2004) e GABAérgico (Brambilla et al., 2003), além da via L-arginina-óxido nítrico (Da Silva et al., 2000; Harkin et al., 1999; 2003). Da mesma forma, tem se buscado elucidar com precisão os mecanismos intracelulares e bioquímicos responsáveis pelos efeitos terapêuticos dos antidepressivos.

1.2.1. Hipótese neurotrófica da depressão

Dentre os fatores ambientais que podem desencadear a depressão o estresse parece ser um dos principais uma vez que, aproximadamente 60% dos episódios do transtorno são precedidos por um evento estressante (Post, 1992).

Muitos trabalhos têm enfatizado a importância do hipocampo, especialmente a neurogênese na região do giro denteado dessa estrutura, na mediação da resposta aos antidepressivos. O hipocampo é vulnerável aos glicocorticóides liberados em situações estressantes sofrendo atrofia durante períodos crônicos de exposição a estes (Samuels e Hen, 2011). Além disso, sabe-se que os glicocorticóides inibem a proliferação e diferenciação de progenitores neurais e a sobrevivência de novos neurônios (Wong e Herbert, 2004).

A liberação de glicocorticóides é controlada pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), um componente essencial da capacidade do indivíduo de resposta ao estresse cuja estimulação excessiva está relacionada à depressão (Berton e Nestler, 2006). Diversos estudos com humanos têm demonstrado que pacientes deprimidos apresentam um volume hipocampal reduzido (Videbech and Ravnkilde 2004). Em modelos animais a hipercortisolemia aumenta a excitotoxicidade de neurônios hipocampais, levando à atrofia e perda dendrítica, assim como à inibição da neurogênese nesta estrutura, sendo estas alterações prevenidas pelo tratamento com antidepressivos (Duman, 2004; Dranovsky e Hen, 2006). Esses resultados sugerem a possibilidade de que o tratamento crônico com antidepressivos tenha uma ação neuroprotetora no hipocampo (Schmidt et al., 2008).

Um grande número de evidências reforça essa hipótese demonstrando que o tratamento da depressão leva a um aumento na sinalização intracelular via AMPc e ativação de cascatas de sinalização intracelular que culminam na fosforilação do elemento de ligação de resposta ao AMPc (CREB). O fator de transcrição CREB por sua vez, ativa a produção de uma série de neurotrofinas, merecendo destaque o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Nestler et al., 2002). O aumento nos níveis de BDNF aumenta a sobrevivência neuronal e reverte a atrofia observada no córtex e hipocampo de pacientes com o transtorno (Castrén, 2004).

Estudos experimentais têm demonstrado resultados consistentes com a hipótese de que a menor expressão de BDNF esteja associada à depressão e que seu aumento desempenha um papel na ação de

antidepressivos (Duman e Monteggia, 2006). Em estudos post-mortem observou-se que indivíduos diagnosticados com o transtorno possuíam níveis reduzidos de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo, quando comparados com o grupo controle. Reforçando essa hipótese, em estudos post-mortem que analisaram pacientes que receberam terapia farmacológica com antidepressivos observou-se que a expressão de BDNF estava aumentada ou inalterada com relação ao controle (Chen et al., 2001; Karege et al., 2005).

Entretanto, o BDNF não é o único fator neurotrófico envolvido na depressão maior. Estudos tem demonstrado evidências do envolvimento de outras neurotrofinas como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Fournier e Duman, 2011), o NGF (Shi et al., 2010), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (Park et al., 2011) e o FGF-2 (Jarosik et al., 2011). Dados pré-clínicos demonstram que o aumento de fatores neurotróficos observado na administração crônica de antidepressivos envolve também a ativação das vias de sinalização intracelular das MAPKs e/ou da PI3K (Kodama et al., 2005; Mercier et al., 2004). A ativação dessas vias converge para um aumento na expressão do fator de transcrição CREB, que por sua vez vai mediar a transcrição gênica de neurotrofinas. As cascatas de sinalização intracelular ativadas por essas vias são um alvo em potencial para o desenvolvimento de novas drogas antidepressivas (Pittenger e Duman, 2008).

1.2.2. Sistema Glutamatérgico e Depressão

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e, após liberado na fenda sináptica, pode se ligar a uma série de receptores ionotrópicos ou metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos compreendem os do tipo NMDA, ácido α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico (AMPA) e os receptores para kainato (Meldrum, 2000). Os receptores metabotrópicos (mGLUR), por sua vez, abrangem oito subtipos de receptores conforme sua homologia estrutural e função farmacológica (Coutinho e Knopfel, 2002). Além disso, cinco transportadores de glutamato foram identificados no SNC de mamíferos, sendo dois deles predominantes nas células da glia e três em neurônios (Seal e Amara, 1999).

O glutamato está presente na maioria das sinapses centrais, atuando em diferentes funções tais como memória, aprendizado, cognição e formação de redes neurais no desenvolvimento e envelhecimento (Ozawa et al., 1998). Entretanto, a hiperativação do

sistema glutamatérgico leva a uma excitotoxicidade devido ao aumento nos níveis de cálcio intracelular desencadeando uma série de eventos que culminam na morte celular (Lipton e Rosenberg, 1994). Como mencionado anteriormente, na sinapse, após a ativação dos receptores e ocorrência do influxo iônico e/ou modulação da produção de segundos mensageiros na célula pós-sináptica, o glutamato precisa ser removido da fenda sináptica por sistemas de transporte, sendo os astrocitários os principais responsáveis (Amara e Fontana, 2002).

A excitotoxicidade glutamatérgica no hipocampo está implicada nos transtornos de humor (Zarate et al., 2002) sendo que, níveis elevados de estresse e glicocorticóides (presentes em pacientes depressivos) estão relacionados a um aumento nos níveis de glutamato extracelular (Lowy et al., 1995). Nos últimos anos, ocorreu um acúmulo de evidências que relacionam uma disfunção no sistema glutamatérgico com os transtornos psiquiátricos (Bonanno et al., 2005). Entre os diversos dados que relacionam anormalidades glutamatérgicas em pacientes diagnosticados com depressão estão estudos que demonstram a atrofia de regiões do SNC diretamente envolvidas com o transtorno e níveis elevados de glutamato nas mesmas (Sanacora et al., 2004), assim como uma diminuição na densidade neuronal e glial (Drevets et al., 1992; Sheline et al., 1996). Além disso, foram encontrados níveis séricos de glutamato elevados em pacientes depressivos (Mauri et al., 1998) e uma associação entre esses níveis e a severidade dos sintomas (Mitani et al., 2006). Cabe ressaltar que esse aumento é revertido com o tratamento antidepressivo, sugerindo um possível papel do sistema glutamatérgico na ação dos antidepressivos convencionais (Maes et al., 1998).

Sendo assim, o papel das células da glia na captação do glutamato torna-se relevante nos processos patofisiológicos envolvidos nos transtornos de humor (Kugaya and Sanacora 2005). Essa importância pode ser observada em estudos post-mortem com indivíduos depressivos, onde se observa um volume glial reduzido (Cotter et al., 2001; Rajkowska and Miguel-Hidalgo 2007). Além disso, animais submetidos a protocolos de estresse apresentam um decréscimo significativo na proliferação das células da glia (Banar e Duman 2008; Banar et al., 2010).

Sabe-se que os antagonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA podem modular o sistema monoaminérgico (Loscher et al., 1991; Wedzoni et al., 1997) assim como os antidepressivos clássicos que agem sobre as monoaminas afetam a funcionalidade desses

receptores (Paul et al., 1994; Kiefer et al., 1999). Existe uma hipótese de que o efeito funcional da terapia antidepressiva convencional seria sua ação indireta inibindo a expressão e função dos receptores NMDA. Ressalta-se ainda, que os antagonistas destes receptores também demonstram efeito tipo-antidepressivo em modelos animais e eficácia no tratamento clínico do transtorno (Skolnick, 1999; Zarate et al., 2006). Dessa forma, possivelmente alterações neuronais devem preceder os efeitos terapêuticos dos antidepressivos que agem sobre as monoaminas e essas adaptações ocorrem durante o período em que o fármaco ainda não demonstrou efeito. Sendo assim, os antagonistas de receptores NMDA poderiam resultar em uma eficácia mais rápida e direta (Skolnick, 2009).

Nos últimos 20 anos, uma grande quantidade de trabalhos tem reportado resultados pré-clínicos favoráveis a essa idéia em modelos animais preditivos para atividade antidepressiva. Esses dados incluem diversas substâncias que atuam nos receptores NMDA como antagonistas não-competitivos (cetamina, memantina, MK-801), antagonistas competitivos (AP-7, CGP 37849), antagonistas da subunidade NR2B (eliprodil, Ro 25-6981), assim como íons que bloqueiam sítios específicos do receptor (Mg^{2+} , Zn^{2+}) (Rosa et al., 2003; Paul e Skolnick, 2003; Nowak et al., 2005; Almeida et al., 2006; Maeng et al., 2008; Cardoso et al., 2008; Li et al., 2011).

Os estudos clínicos com antagonistas de receptores NMDA para o tratamento da depressão tem se focado principalmente na cetamina sendo que esta demonstrou eficácia em reverter os sintomas depressivos de pacientes em doses sub-anestésicas. Os dados experimentais evidenciaram também que a administração de dose única de cetamina não apenas é efetiva em reverter os sintomas de forma aguda, como também em demonstrar eficácia em pacientes que não responderam à terapia convencional, assim como em manter esse efeito antidepressivo por um período prolongado de uma semana (Berman et al., 2000; Zarate et al., 2006; Liebrez et al., 2007; Diazgranados et al., 2010).

Em animais, os antagonistas de receptores NMDA, cetamina e Ro 25-6981, produziram um efeito antidepressivo agudo em modelos comportamentais que apresentam resposta apenas a tratamento crônico, além de um aumento rápido na densidade e funcionamento das espinhas sinápticas. Cabe ressaltar, que esses efeitos se mostraram dependentes de uma consequente ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA (Li et al., 2010; Zarate et al., 2010). No SNC de mamíferos, os receptores AMPA estão envolvidos na mediação da neurotransmissão

excitatória rápida e intimamente relacionados com a plasticidade sináptica (Lee e Kirkwood, 2011). Dados pré-clínicos com diversos moduladores desses receptores demonstram efeito antidepressivo em modelos animais (Alt et al., 2006; Sanacora et al., 2008) e a forma como a modulação desses receptores se relaciona com o efeito da cetamina tem sido foco de estudos (Fleming e England, 2010; Hashimoto, 2010; Zarate et al. 2010).

Além de ser mediado pela ativação dos receptores AMPA, o efeito antidepressivo da cetamina é dependente também da ativação da via de sinalização intracelular da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Li et al., 2010; Duman et al., 2012). A mTOR é uma serina-treonina cinase que regula a iniciação da tradução protéica sendo que nos processos dendríticos regula a síntese de novas proteínas necessárias para a sinaptogênese. O funcionamento da mTOR é considerado um ponto de convergência da atividade de receptores glutamatérgicos, dopaminérgicos, e do BDNF através de cascatas de sinalização intracelular, principalmente a via da PI3K/Akt (Hoeffler e Klann, 2010; Li et al., 2010). Em pacientes depressivos, os níveis de mTOR e proteínas sinápticas sintetizadas por sua ativação encontram-se significativamente reduzidas em comparação ao grupo controle (Jernigan et al., 2011). Entretanto, apesar de tanto a inativação de receptores NMDA quanto o BDNF ativarem a via da PI3K/Akt/mTOR, ainda é controverso se essa neurotrofina é essencial para o efeito de antagonistas NMDA sobre a síntese de proteínas sinápticas e consequente efeito antidepressivo (Autry et al., 2011, Lindholm et al., 2011).

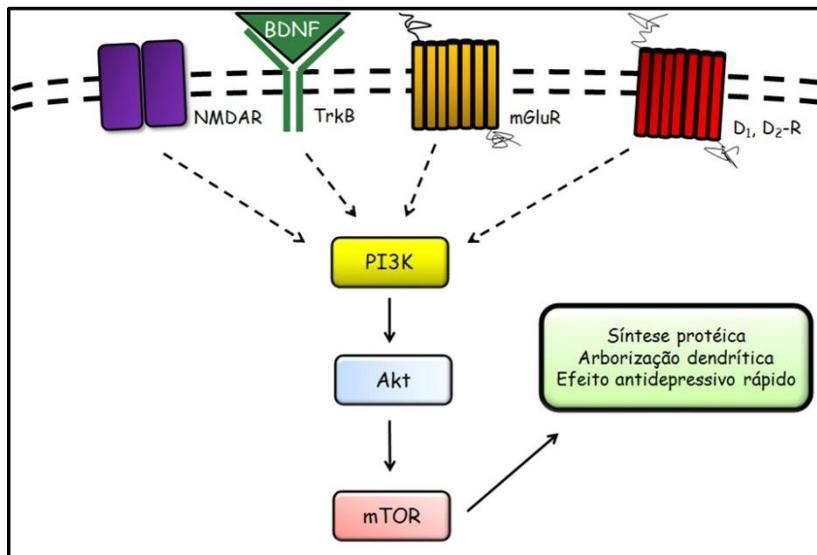


Figura 3. Mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo de antagonistas de receptores NMDA. Receptores glutamatérgicos (NMDA e mGluR), tirosina cinase (TrkB) e dopaminérgicos (D₁ e D₂) ativam vias de sinalização intracelular essenciais para a atividade antidepressiva. A Akt ativada pela fosfatidilinositol 3'-cinase (PI3K) fosforila a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), reguladora de diversos efetores da síntese proteica tanto no corpo celular como nos dendritos dos neurônios. A síntese de proteínas sinápticas estimulada por essa cascata de sinalização aumenta a arborização dendrítica e ocasiona um efeito antidepressivo de forma rápida e duradoura.

1.2.3. Depressão e Óxido Nítrico

A descoberta da função do óxido nítrico (NO) como molécula sinalizadora alterou radicalmente o conceito de comunicação neural (Esplugues, 2002). O NO é uma molécula que atravessa livremente a membrana celular não sendo estocado em vesículas sinápticas nem liberado por exocitose e que possui múltiplos alvos, desempenhando um papel em diversos processos fisiológicos do organismo. Além disso, é considerado uma importante substância neurotransmissora e neuromoduladora, entretanto, também está envolvido em patologias do SNC como epilepsia, esquizofrenia, ansiedade e depressão (Dhir e Kulkarni, 2011). O NO está implicado também na morte neuronal induzida por glutamato (Strijbos et al., 1996), estando relacionado também ao estresse oxidativo em condições patológicas como isquemia

e doenças neurodegenerativas (Guix et al., 2005; Shahani e Sawa, 2011).

O NO é produzido por um grupo de proteínas chamadas óxido nítrico sintase (NOS) as quais são enzimas dependentes de Ca^{2+} que utilizam a L-arginina para produzir NO e L-citrulina (Guix et al., 2005). Essa síntese pode ocorrer mediante a ação de três diferentes isoformas da NOS: neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e endotelial NOS (eNOS) (Magarinos e McEwen, 1995). No cérebro de mamíferos, mais de 90% da produção é realizada pela nNOS (Joca et al., 2007). Um dos alvos intracelulares do NO é a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (Moncada, 1994).

A investigação do papel do NO na depressão começou a ser encorajada principalmente depois de se constatar que a paroxetina, um ISRS, é também um inibidor da NOS (Finkel et al., 1996). A partir de então, um grande número de trabalhos demonstrou evidências de que o NO está envolvido na patofisiologia do transtorno. Foi observado que em pacientes depressivos ocorre um aumento na produção de NO (Li et al., 2006; Suzuki et al., 2001) e que substâncias que inibem a NOS ou a GCs tem efeito antidepressivo em modelos pré-clínicos (Yildiz et al., 2000; Harkin et al., 2003; Kaster et al., 2005; Joca e Guimarães, 2006). Além disso, o efeito de antidepressivos convencionais como a imipramina, a bupropiona e a venlafaxina é revertido por substâncias que aumentam os níveis de NO em modelos pré-clínicos (Harkin et al., 1999; Dhir e Kulkarni, 2007a, b; Krass et al., 2011). Assim como os antidepressivos monoaminérgicos diminuem a atividade da NOS no hipocampo foi demonstrado que o oposto também ocorre, uma vez que inibidores da NOS aumentaram os níveis de serotonina e dopamina nessa estrutura (Wegener et al., 2003).

Cabe ressaltar que o estresse crônico causa um aumento na expressão da NOS no hipocampo assim como uma já mencionada diminuição da neurogênese nessa estrutura. Da mesma forma, esse prejuízo pode ser revertido mediante o tratamento com inibidores da nNOS, restaurando a neurogênese e as alterações comportamentais dos animais submetidos ao estresse crônico (Joca e Guimarães, 2006; Khovriakov et al., 2009).

O aumento nos níveis de GMPc ocasionado pela estimulação da enzima GCs modula a atividade de alvos intracelulares como as proteínas cinases dependentes de GMPc (PKG) assim como de canais iônicos (Garthwaite e Boulton, 1995). Dessa forma, a ativação da via L-

arginina-NO pode levar a uma alteração na excitabilidade neural e propagação de sinal pelo sistema nervoso através da abertura de canais de potássio (K^+) e consequente hiperpolarização da membrana plasmática do neurônio (MacKinnon, 2003). Evidências em estudos pré-clínicos apontam para o envolvimento da redução nos níveis de GMPc e da inibição dos canais de K^+ no efeito tipo-antidepressivo de diversos compostos (Kaster et al., 2005, 2007; Budni et al., 2007; Dhir e Kulkarni, 2008; Wilhelm et al., 2010; Moretti et al., 2011).

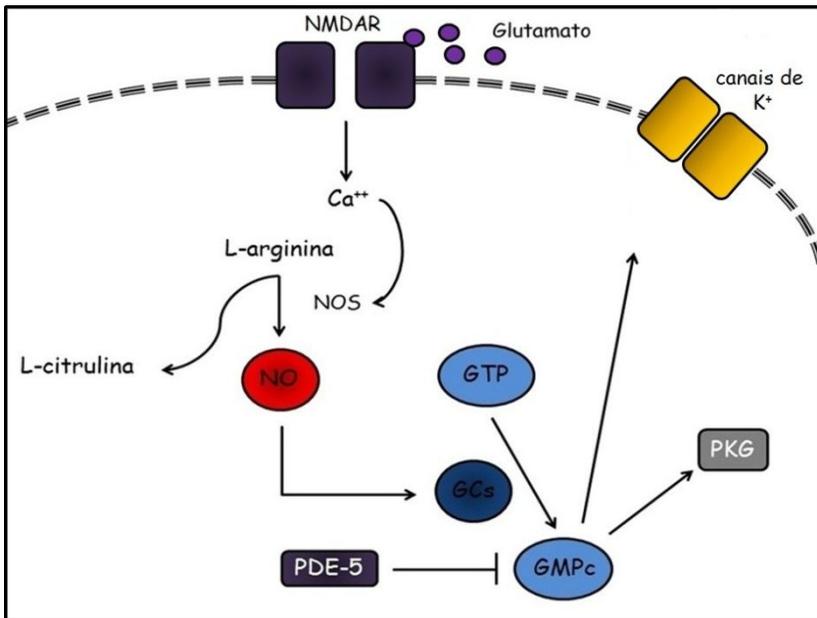


Figura 4. Síntese e alvos do óxido nítrico (NO). A estimulação dos receptores NMDA e consequente influxo de Ca^{2+} no neurônio ativa a enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS utiliza a L-arginina como substrato para formar NO e L-citrulina. O NO formado estimula a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), responsável pela produção de GMPc a partir do GTP. O GMPc é degradado pela fosfodiesterase-5 (PDE-5) e seus níveis modulam a atividade de vários alvos intracelulares como proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) e canais de K^+ .

1.2.4. Modelos Animais de Depressão

O teste do nado forçado (TNF) e o teste da suspensão pela cauda (TSC) são os modelos animais preditivos mais utilizados para identificação do potencial antidepressivo de compostos. O TNF foi descrito primeiramente por Porsolt et al. (1977), sendo utilizado em ratos e posteriormente adaptado para camundongos, enquanto o TSC foi descrito em camundongos por Steru et al. (1985). Ambos os testes são baseados na observação de que os animais, colocados diante de uma situação inescapável, desenvolvem uma postura de imobilidade após tentativas iniciais de sair dessa situação. O tempo de imobilidade reflete a persistência em escapar ou o desencorajamento do animal para buscar formas ativas de lidar com um estímulo estressante. Por razões ainda não elucidadas, uma única exposição ao teste gera um estado de imobilidade em camundongos, cujo tempo é reduzido pelo tratamento agudo com drogas antidepressivas. Além disso, os testes permitem o estudo de novas hipóteses moleculares na neurobiologia da depressão (Lucki, 1997; Krishnan e Nestler, 2010). Apesar de possuir apenas validade preditiva, ambos os testes são amplamente utilizados devido ao fácil uso e boa reprodutibilidade observada (Cryan et al., 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Um crescente número de evidências tem demonstrado o potencial terapêutico de compostos que modulam o sistema glutamatérgico. Levando em conta o papel da guanosina como estimuladora da captação de glutamato (Schmidt et al., 2007; Oleskovics et al., 2008) e a possibilidade de o efeito antidepressivo do GMP observado em modelos animais (Eckeli et al., 2000) estar relacionado à sua conversão em guanosina, este trabalho se propõe a avaliar o efeito desse nucleosídeo nos modelos comportamentais do TNF, TSC e no teste do campo aberto (TCA). Da mesma forma, a investigar também o possível envolvimento dos receptores NMDA, da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc e de algumas vias de sinalização intracelular relacionadas à atividade desses receptores (PI3K e mTOR).

O tratamento atual para a depressão ainda está longe do ideal, pois o tempo de latência para obter benefícios clínicos é relativamente longo (pode durar de 3 a 5 semanas) e a terapia farmacológica disponível produz também uma grande quantidade de efeitos colaterais. Sendo assim, há uma grande demanda por novos fármacos com ação rápida, segura e efetiva para a depressão (Berton e Nestler, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração oral de guanosina no TNF, no TSC e no TCA, assim como o envolvimento dos receptores NMDA, da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc e de vias sinalização intracelular relacionadas à atividade desses receptores.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito tipo-antidepressivo da administração oral (p.o.) de guanosina no TNF, no TSC e no TCA;
- Investigar o envolvimento dos receptores NMDA na ação antidepressiva da guanosina no TSC;
- Investigar a participação da via L-arginina-óxido nítrico na ação antidepressiva da guanosina no TSC;
- Investigar o envolvimento do GMPc na ação antidepressiva da guanosina no TSC;
- Avaliar a participação da PI3K e da mTOR na ação antidepressiva da guanosina no TSC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss adultos de ambos os sexos, pesando entre 30-45 g e com idade entre 50 e 55 dias. Os animais foram mantidos a temperatura de 21-23 °C com livre acesso à água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (ciclo claro iniciando às 7:00 h). Todos os experimentos foram realizados entre 11:00 e 17:00 horas, com cada animal usado somente uma vez (N = 7-9 animais por grupo). Os camundongos foram ambientados no local da experimentação 24 horas antes da observação comportamental e distribuídos de forma aleatória nos grupos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS

4.2.1. Teste do nado forçado (TNF):

O TNF é um dos modelos comportamentais mais utilizados para detectar a atividade antidepressiva de compostos e fármacos. O método original foi descrito por Porsolt (1977) e baseia-se na observação de que quando os animais são submetidos a uma situação onde não há possibilidade de escape, após um período de agitação inicial adotam uma postura de imobilidade. O camundongo é considerado imóvel quando flutua ou faz apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. Os animais foram colocados em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de 25°C ± 1°C e o tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 minutos. Uma redução significativa no tempo de imobilidade é observada após a administração aguda de drogas com potencial antidepressivo (Porsolt et al., 1977).



Figura 5. Teste do Nado Forçado

4.2.2. Teste da suspensão pela cauda (TSC):

O TSC foi proposto por Steru et al. (1985) como alternativa ao TNF para o estudo de compostos com possível atividade antidepressiva, uma vez que parece ser menos estressante que o TNF (Thierry et al., 1986). O tempo de imobilidade é avaliado durante um período de 6 minutos em camundongos acústica e visualmente isolados, suspensos pelo menos 50 cm acima do chão e presos pela extremidade da cauda com fita adesiva (Cunha et al., 2008; Moretti et al., 2011).



Figura 6. Teste de suspensão pela cauda

4.2.3. Teste do campo aberto (TCA):

A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC seja devido a uma estimulação motora, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, durante 6 minutos (Rodrigues et al., 2002). Este teste é realizado em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com a base dividida em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. A base da caixa de madeira é limpa com álcool entre os testes sendo estes realizados em uma sala com temperatura e luz controladas.



Figura 7. Teste do campo aberto

4.3. DROGAS E TRATAMENTOS

4.3.1. Vias de administração

Os compostos utilizados foram administrados pelas vias oral (p.o.) e intraperitoneal (i.p.) em um volume de 10 ml/kg, ou ainda pela via intracerebroventricular (i.c.v.), em um volume constante de 5 µl/sítio.

Para administração i.c.v. foi utilizada uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25 µl. Os animais foram anestesiados com éter e a agulha foi inserida perpendicularmente no crânio, diretamente no ventrículo

lateral, utilizando-se o bregma como referência. A injeção foi administrada durante 30 s, e manteve-se a agulha no local por mais 30 s a fim de evitar o refluxo das substâncias injectados. O local da injeção foi de 1 mm para a direita ou à esquerda do ponto médio de uma linha traçada até a base anterior das orelhas. Após a conclusão dos experimentos todos os animais foram decapitados e os seus cérebros foram examinados. Os resultados de camundongos que apresentaram qualquer sinal de hemorragia cerebral foram excluídos da análise estatística (total inferior a 5% dos animais utilizados).

4.3.2. Avaliação do efeito antidepressivo da guanosina no TNF e no TSC e da atividade locomotora no TCA

Para a obtenção da curva dose-resposta da administração sistêmica de guanosina (Sigma Chemical Co, USA) no TNF, os animais foram tratados com doses crescentes do composto (0,1-5 mg/kg, p.o.), com fluoxetina (20 mg/kg, p.o.) ou água destilada, sendo submetidos ao teste após 60 min.

Da mesma forma, os animais foram administrados com guanosina (0,01-0,5 mg/kg, p.o.), fluoxetina (10 mg/kg) ou água destilada (grupo controle) e após 60 minutos, submetidos ao TSC ou ao TCA.

Tanto as doses de guanosina quanto a de fluoxetina foram dissolvidas em água destilada.

4.3.3. Avaliação do mecanismo de ação antidepressiva da guanosina no TSC

4.3.3.1. Envolvimento dos receptores NMDA

Os seguintes compostos foram utilizados: cetamina, N-metil-D-aspartato (NMDA), MK-801 e D-serina (todas obtidas de Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Os fármacos foram dissolvidos em salina (NaCl 0,9%) com 1% de DMSO, exceto a ketamina (dissolvida em salina) e o MK-801 (dissolvido em água destilada).

A fim de verificar a influência dos receptores NMDA na ação antidepressiva da guanosina, os animais foram tratados com guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) e decorridos 45 minutos receberam NMDA (0,1 pmol/sítio, agonista seletivo de receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA, dose que não produz convulsão) ou D-serina (30 µg/sítio,

agonista do sítio da glicina dos receptores NMDA). Após 15 minutos os animais foram submetidos ao TSC ou ao TCA. Alternativamente, para verificar a existência de um possível efeito sinérgico entre a guanosina e antagonistas de receptores NMDA, uma dose sub-ativa de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o., antagonista não competitivo de receptores NMDA) foi administrada seguida de uma dose sub-ativa de guanosina (0,01 mg/kg, p.o.). Os animais foram submetidos aos testes comportamentais decorridos 60 minutos do tratamento. Da mesma forma, os animais foram tratados também com dose sub-ativa de guanosina (0,01 mg/kg, p.o.) e, após 30 minutos, receberam uma dose sub-ativa de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.), sendo submetidos ao TSC ou TCA após um período de mais 30 minutos. O protocolo experimental e as doses foram escolhidas de acordo com estudos prévios (Mantovani et al., 2003; Brocardo et al., 2008; Moretti et al., 2011).

4.3.3.2. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico

Para investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico-GMPc, os seguintes compostos foram utilizados: L-arginina, 7-nitroindazol (7-NI), [1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona] (ODQ) e sildenafil (todas de Sigma Chemical Co, USA). Os fármacos foram diluídos em salina exceto o ODQ, que foi dissolvido em salina com 1% de DMSO. A via de administração utilizada foi a i.p., exceto o ODQ, que foi administrado por via i.c.v.

Com o objetivo de verificar a participação da via L-arginina-óxido nítrico sobre a atividade antidepressiva da guanosina, os animais foram pré-tratados com L-arginina (750 mg/kg, i.p., precursor do NO) ou sildenafil (5 mg/kg, i.p., inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 (PDE-5)) e, após 30 minutos, receberam uma dose de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.). Sessenta minutos após a administração de guanosina, os animais foram submetidos ao TSC ou TCA.

Em outro experimento, os animais foram tratados com dose sub-ativa de guanosina (0,01 mg/kg, p.o.) e após 30 minutos receberam 7-NI (50 mg/kg, i.p., inibidor específico da enzima óxido nítrico sintase neuronal) ou ODQ (30 pmol/sítio, i.c.v., inibidor específico da GCs) após 45 minutos. Os camundongos foram submetidos ao TSC ou ao TCA 30 minutos após a administração de 7-NI ou 15 minutos após a administração de ODQ. Os protocolos experimentais e as doses foram escolhidos de acordo com estudos prévios (Brocardo et al., 2008; Zomkowski et al., 2010).

4.3.3.3. Envolvimento de vias de sinalização intracelular

Para avaliar a participação de vias de sinalização intracelular específicas no efeito tipo-antidepressivo da guanosina no TSC as seguintes drogas foram utilizadas: LY294002, wortmanina e rapamicina. (todas de Sigma Chemical Co, USA). Os fármacos foram diluídos em DMSO (1%), exceto a rapamicina (diluída em DMSO 100%) e administrados por via i.c.v.

A investigação da via da PI3K foi feita através da administração de dose ativa de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) seguida por administração de LY294002 (10 µg/sítio, i.c.v., inibidor reverssível da PI3K) ou wortmanina (0,1 µg/sítio, i.c.v., inibidor irreverssível da PI3K) 45 minutos depois, sendo que os camundongos foram submetidos ao TSC ou TCA após mais 15 minutos.

Da mesma forma, para investigação da participação da mTOR, os animais foram tratados com guanosina (0,05 mg/kg) e receberam rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v., inibidor específico da mTOR) após 45 minutos, sendo submetidos ao TSC ou TCA 15 minutos depois. A doses escolhidas foram baseadas em estudos prévios (Budni et al., 2011; Li et al., 2011).

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias (de acordo com o protocolo experimental), seguido pelo post-hoc de Duncan quando apropriado. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE GUANOSINA NO TEMPO DE IMOBILIDADE DOS ANIMAIS NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TCA

A **Figura 8** mostra que a administração sistêmica (p.o.) de guanosina produziu uma redução significativa no tempo de imobilidade dos animais no TNF (0,5-5 mg/kg) e no TSC (0,05-0,5 mg/kg), sem provocar alteração na atividade locomotora dos animais no TCA, demonstrando um efeito tipo-antidepressivo nos dois modelos preditivos. Um grupo a parte recebeu tratamento com fluoxetina (F) como controle positivo no TNF (20 mg/kg, p.o.) e no TSC (10 mg/kg, p.o.).

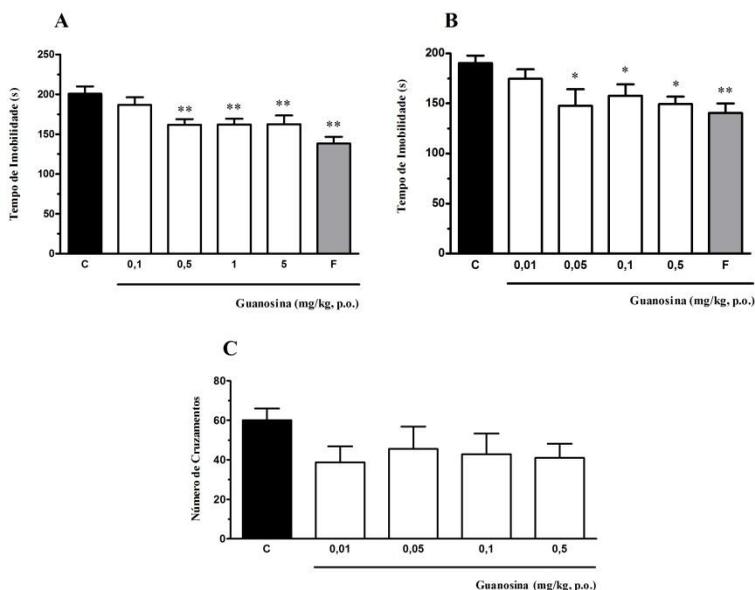


Figura 8. Efeito da administração aguda de guanosina no TNF (0,1-5 mg/kg, p.o., painel A), TSC (0,01-0,5 mg/kg, p.o., painel B) e TCA (0,01-0,5 mg/kg, p.o., painel C). A fluoxetina (F) foi utilizada como controle positivo no TNF (20 mg/kg, p.o.) e no TSC (10 mg/kg, p.o.). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (N = 7-9). *P < 0,05; **P < 0,01 quando comparado aos

animais tratados com veículo (C). Resultados avaliados por ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Duncan.

A) [F(5,41) = 6,16; P < 0,01]

B) [F(5,36) = 3,33; P < 0,05]

C) [F(4,32) = 0,95; P = 0,45]

Para o estudo de possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antidepressivo da guanosina observado em ambos os modelos comportamentais, o presente trabalho optou pela utilização do TSC. O motivo da escolha se deve ao fato de este teste ter se mostrado mais sensível ao tratamento dos animais com guanosina. Os dados obtidos vão ao encontro da literatura, uma vez que é proposto que o TSC possui uma sensibilidade farmacológica maior em comparação ao TNF (Thierry et al., 1986).

5.2. ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES NMDA NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TCA

A **Figura 9A** mostra que o tratamento com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.) foi efetivo em reverter o efeito de uma dose ativa de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC. A administração de NMDA *per se* ou em combinação com a guanosina não afetou a atividade locomotora dos animais no TCA como mostrado na **Figura 9B**.

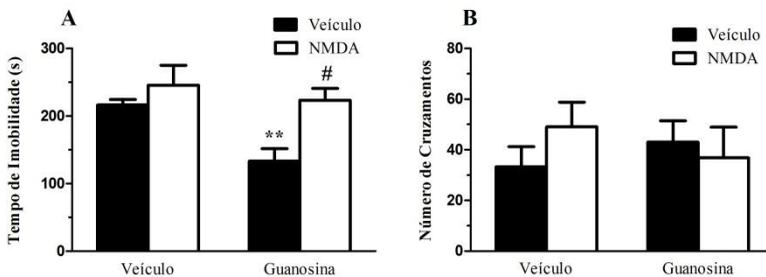


Figura 9. Efeito do tratamento com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.) na redução do tempo de imobilidade causada pela guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-9). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. **P < 0,01 quando comparado ao

Resultados

grupo tratado com veículo; # $P < 0,05$ em relação ao mesmo grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [$F(1,32) = 21,09$; $P < 0,01$], tratamento com NMDA [$F(1,32) = 13,26$; $P < 0,01$] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com NMDA [$F(1,32) = 4,45$; $P < 0,05$].

B) Tratamento com guanosina [$F(1,24) = 0,24$; $P = 0,62$], tratamento com NMDA [$F(1,24) = 0,01$; $P = 0,90$] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com NMDA [$F(1,24) = 1,27$; $P = 0,27$].

Os resultados da **Figura 10** mostram que o tratamento dos animais com D-serina (30 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v., co-agonista de receptores NMDA) preveniu o efeito antidepressivo provocado pela administração de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC, sem causar alteração significativa na atividade locomotora.

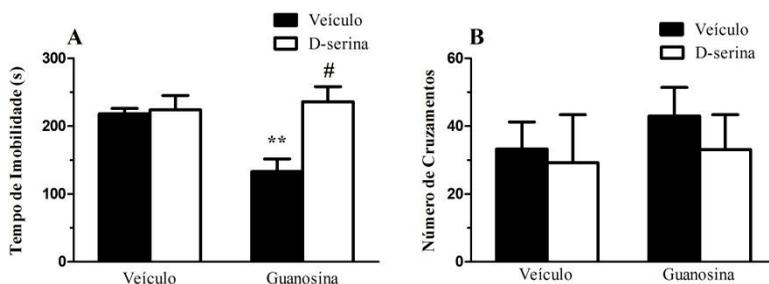


Figura 10. Efeito do tratamento dos animais com D-serina (30 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) sobre a redução do tempo de imobilidade ocasionada pela administração de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e sobre a atividade locomotora no TCA (painel B). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 7-9). ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo tratado com veículo; # $P < 0,05$ quando comparado ao mesmo grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [$F(1,26) = 8,02$; $P < 0,01$], tratamento com D-serina [$F(1,26) = 0,01$; $P = 0,90$] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com D-serina [$F(1,26) = 6,35$; $P < 0,05$].

B) Tratamento com guanosina [$F(1,26) = 0,43$; $P = 0,51$], tratamento com D-serina [$F(1,26) = 0,41$; $P = 0,53$] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com D-serina [$F(1,26) = 0,08$; $P = 0,78$].

A **Figura 11A** mostra que a administração de uma dose sub-ativa de guanosina (0,01 mg/kg, p.o.) combinada com uma dose sub-

ativa de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o., antagonista de receptores NMDA) reduziu significativamente o tempo de imobilidade no TSC. A **Figura 11B** demonstra que a administração de MK-801 *per se* ou em combinação com guanosina não afetou a atividade locomotora no TCA.

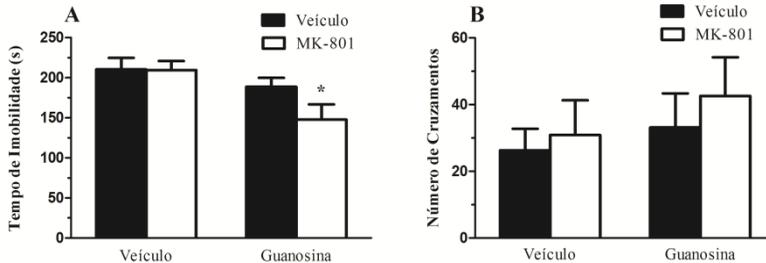


Figura 11. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.) e guanosina (0,01 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-9). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. *P < 0,05 em relação ao grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [F(1,29) = 4,62; P < 0,05], tratamento com MK-801 [F(1,29) = 14,09; P < 0,01] e interação tratamento com guanosina × tratamento com MK-801 [F(1,29) = 4,35; P < 0,05].

B) Tratamento com guanosina [F(1,26) = 0,48; P = 0,49], tratamento com MK-801 [F(1,26) = 0,84; P = 0,36] e interação tratamento com guanosina × tratamento com MK-801 [F(1,26) = 0,06; P = 0,81].

Os resultados ilustrados na **Figura 12** mostram o efeito da co-administração de doses sub-ativas de guanosina (0,01 mg/kg, p.o.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores NMDA) no TSC. Os animais tratados com a combinação de ambas as drogas demonstraram uma redução significativa no tempo de imobilidade em comparação aos tratados com cada droga isoladamente. A análise da atividade locomotora no TCA não demonstrou alterações significativas.

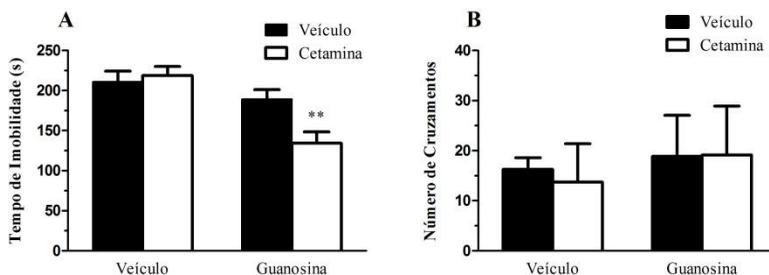


Figura 12. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de guanossina (0,01 mg/kg, i.p.) e cetamina (0,1 mg/kg, p.o.) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-9). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. *P < 0,05 em relação ao grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanossina [F(1,24) = 3,44; P = 0,07], tratamento com cetamina [F(1,24) = 5,99; P < 0,05] e interação tratamento com guanossina × tratamento com cetamina [F(1,24) = 17,20; P < 0,01].

B) Tratamento com guanossina [F(1,24) = 0,23; P = 0,88], tratamento com cetamina [F(1,24) = 0,28; P = 0,60] e tratamento com guanossina × tratamento com cetamina [F(1,24) = 0,04; P = 0,85].

5.3. ENVOLVIMENTO DA VIA L-ARGININA-NO-GMPc NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA GUANOSINA NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TCA

Na **Figura 13** estão ilustrados os resultados referentes ao efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (750 mg/kg, i.p., precursor do NO) no efeito anti-imobilidade causado pela guanossina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC. A análise dos dados demonstrou que a L-arginina foi efetiva em prevenir o efeito tipo-antidepressivo da guanossina sem causar uma alteração significativa na atividade locomotora dos animais.

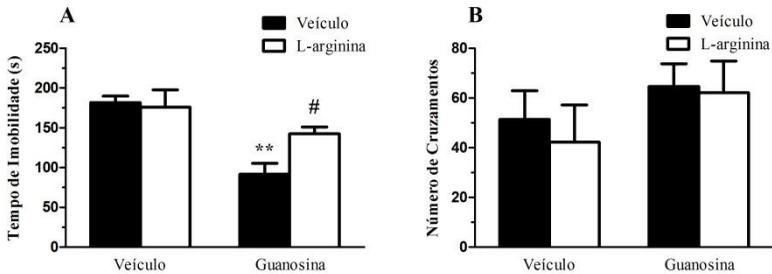


Figura 13. Efeito do pré-tratamento dos animais com L-arginina (750 mg/kg, i.p.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela administração de guanósina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 7-9). ** P < 0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo; #P < 0,05 quando comparado ao mesmo grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanósina [$F(1,24) = 3,53$; $P = 0,07$], tratamento com L-arginina [$F(1,24) = 26,74$; $P < 0,01$] e interação tratamento com guanósina \times tratamento com L-arginina [$F(1,24) = 5,62$; $P < 0,05$].

B) Tratamento com guanósina [$F(1,24) = 0,23$; $P = 0,64$], tratamento com L-arginina [$F(1,24) = 1,83$; $P = 0,19$] e interação tratamento com guanósina \times tratamento com L-arginina [$F(1,24) = 0,07$; $P = 0,79$].

Os resultados apresentados na **Figura 14** mostram o efeito do tratamento oral dos animais com dose sub-ativa de guanósina (0,01 mg/kg) ou 7-NI (50 mg/kg, i.p., inibidor da nNOS), assim como a combinação de ambas no TSC. Foi observada uma redução significativa no tempo de imobilidade dos animais que receberam co-administração de guanósina e 7-NI no TSC, assim como a ausência de alterações significativas na atividade dos animais no TCA.

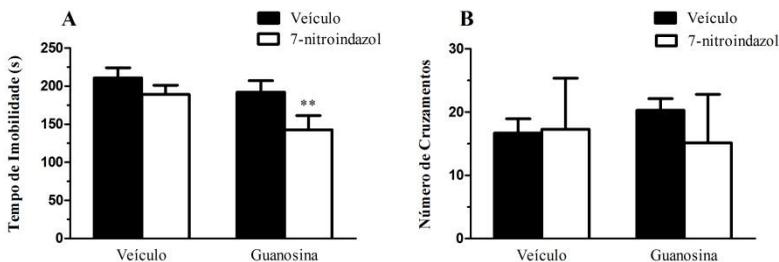


Figura 14. Efeito do co-tratamento com doses sub-ativas de guanosina (0,01 mg/kg, i.p.) e 7-NI (50 mg/kg, i.p.) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-9). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [$F(1,24) = 9,54$; $P < 0,01$], tratamento com 7-NI [$F(1,24) = 19,46$; $P < 0,01$] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com 7-NI [$F(1,24) = 7,03$; $P < 0,05$].

B) Tratamento com guanosina [$F(1,24) = 0,01$; $P = 0,90$], tratamento com 7-NI [$F(1,24) = 0,16$; $P = 0,69$] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com 7-NI [$F(1,24) = 0,25$; $P = 0,62$].

Da mesma forma, os dados expostos na **Figura 15** demonstram uma redução significativa no tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao TSC após tratamento com a combinação de dose sub-ativa de guanosina (0,01 mg/kg, p.o.) com dose sub-ativa de ODQ (30 pmol/sítio, i.c.v., inibidor específico da GCs). A análise da atividade locomotora não demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA.

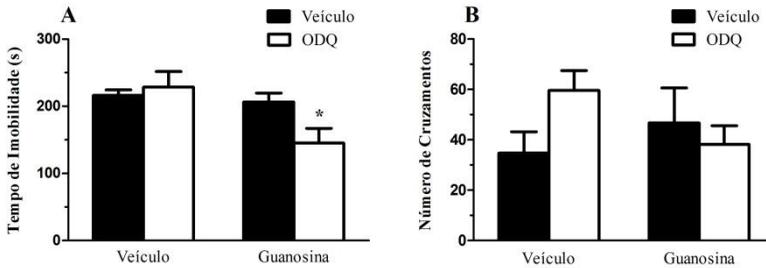


Figura 15. Efeito do tratamento combinado de doses sub-ativas de guanosina (0,01 mg/kg, i.p.) e ODQ (30 pmol/sítio, i.c.v.) no tempo de imobilidade dos animais no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N = 7-9). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. *P < 0,05 em relação ao grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [$F(1,24) = 2,78$; $P = 0,10$], tratamento com ODQ [$F(1,24) = 8,57$; $P < 0,05$] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com ODQ [$F(1,24) = 5,62$; $P < 0,01$].

B) Tratamento com guanosina [$F(1,24) = 0,69$; $P = 0,41$], tratamento com ODQ [$F(1,24) = 0,23$; $P = 0,63$] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com ODQ [$F(1,24) = 2,91$; $P = 0,10$].

Os dados experimentais ilustrados na **Figura 16** demonstram que o pré-tratamento dos animais com sildenafil (5 mg/kg, i.p., inibidor da PDE-5) foi efetivo em prevenir o efeito antidepressivo exercido pela guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC, sem causar alterações significativas na atividade locomotora.

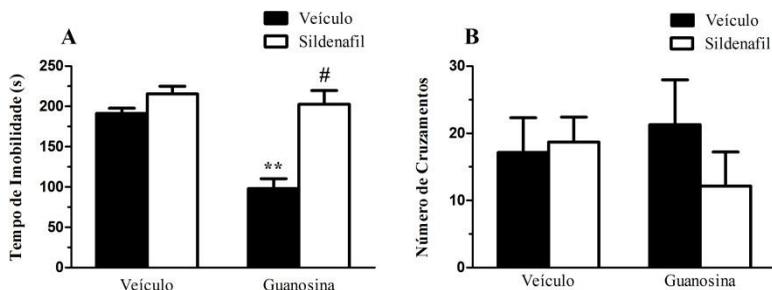


Figura 16. Efeito do pré-tratamento dos animais com sildenafil (5 mg/kg, i.p.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela administração de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 7-9). ** P < 0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo; #P < 0,05 quando comparado ao mesmo grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [F(1,25) = 26,38; P < 0,01], tratamento com sildenafil [F(1,25) = 17,98; P < 0,01] e interação tratamento com guanosina × tratamento com sildenafil [F(1,25) = 10,29; P < 0,01].

B) Tratamento com guanosina [F(1,25) = 0,99; P = 0,33], tratamento com sildenafil [F(1,25) = 0,52; P = 0,48] e interação tratamento com guanosina × tratamento com sildenafil [F(1,25) = 1,50; P = 0,23].

5.4. ENVOLVIMENTO DA PI3K E DA mTOR NA REDUÇÃO DO TEMPO DE IMOBILIDADE DOS ANIMAIS OCASIONADA PELA GUANOSINA NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TCA

Os resultados apresentados na **Figura 17** mostram o efeito do tratamento dos animais com wortmanina (0,1 µg/sítio, i.c.v., o inibidor irreversível da PI3K), na redução do tempo de imobilidade exercida pela administração oral de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC. A análise estatística dos dados demonstrou uma reversão no efeito antidepressivo da guanosina quando os animais são tratados com wortmanina, assim como a ausência de uma variação significativa na atividade locomotora.

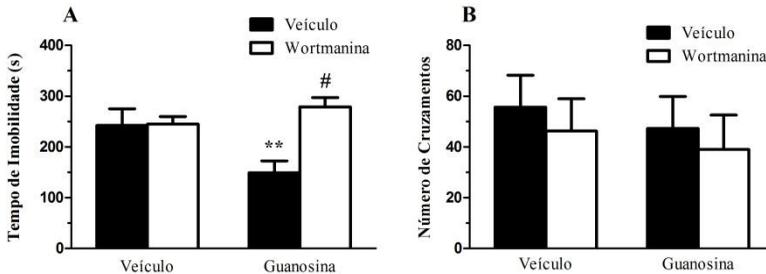


Figura 17. Efeito do tratamento dos animais com wortmanina (0,1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela administração de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e sobre a atividade locomotora no TCA (painel B). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 7-9). ** P < 0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo; #P < 0,05 quando comparado ao mesmo grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [F(1,26) = 9,20; P < 0,01], tratamento com wortmanina [F(1,26) = 1,83; P = 0,18] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com wortmanina [F(1,26) = 8,40; P < 0,01].

B) Tratamento com guanosina [F(1,20) = 0,46; P = 0,50], tratamento com wortmanina [F(1,20) = 0,36; P = 0,55] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com wortmanina [F(1,20) = 0,001; P = 0,97].

Na **Figura 18** estão ilustrados os resultados referentes ao tratamento dos animais com LY294002 (10 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v., inibidor reverssível da PI3K), na redução do tempo de imobilidade ocasionada pela administração oral de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC. A análise estatística dos dados confirmou uma reversão no efeito antidepressivo exercido pela guanosina quando os animais foram tratados com LY294002, assim como nenhuma alteração significativa no TCA.

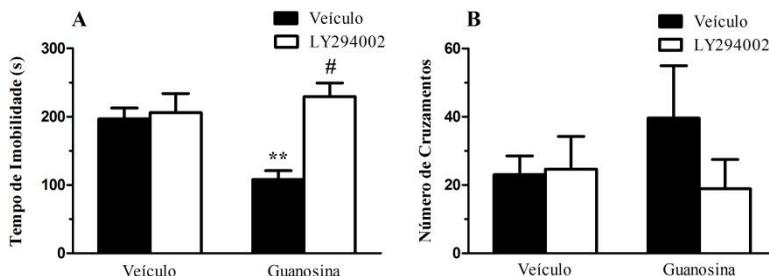


Figura 18. Efeito do tratamento dos animais com LY294002 (10 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) sobre a redução do tempo de imobilidade ocasionada pela administração de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e sobre a atividade locomotora no TCA (painel B). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 7-9). ** P < 0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo; #P < 0,05 quando comparado ao mesmo grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [F(1,25) = 8,75; P < 0,01], tratamento com LY294002 [F(1,25) = 2,16; P = 0,15] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com LY294002 [F(1,25) = 6,45; P < 0,05].

B) Tratamento com guanosina [F(1,27) = 0,87; P = 0,36], tratamento com LY294002 [F(1,27) = 0,28; P = 0,60] e interação tratamento com guanosina \times tratamento com LY294002 [F(1,27) = 1,19; P = 0,28].

A **Figura 19** ilustra os dados obtidos após o tratamento dos animais com rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v., inibidor específico da mTOR) sobre o efeito anti-imobilidade exercido pela guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC. A administração de rapamicina reverteu a redução no tempo de imobilidade causada pelo tratamento dos animais com guanosina no TSC sem demonstrar influência sobre a atividade locomotora no TCA.

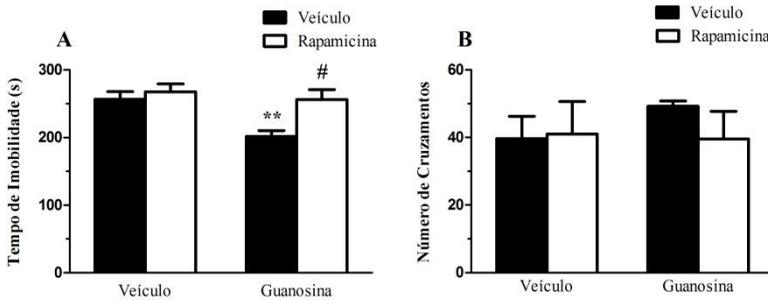


Figura 19. Efeito do tratamento dos animais com rapamicina (0,2 nmol/sítio, i.c.v.) sobre a redução do tempo de imobilidade causada pela administração de guanosina (0,05 mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Resultados avaliados por ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Duncan. Os valores estão expressos como a média + E.P.M. (N = 7-9). ** P < 0,01 quando comparado ao grupo tratado com veículo; #P < 0,05 quando comparado ao mesmo grupo tratado com veículo.

A) Tratamento com guanosina [F(1,23) = 9,28; P < 0,01], tratamento com rapamicina [F(1,23) = 9,59; P < 0,01] e interação tratamento com guanosina × tratamento com rapamicina [F(1,23) = 4,93; P < 0,05].

B) Tratamento com guanosina [F(1,18) = 0,33; P = 0,57], tratamento com rapamicina [F(1,18) = 0,30; P = 0,59] e interação tratamento com guanosina × tratamento com rapamicina [F(1,18) = 0,57; P = 0,46].

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração sistêmica de guanosina (por via p.o.) produz um efeito antidepressivo em dois modelos preditivos para atividade antidepressiva, o TNF e o TSC, assim como contribuiu para elucidar alguns dos mecanismos envolvidos nesse efeito. Os dados experimentais demonstraram evidências de que esse efeito parece ser mediado pelos receptores NMDA e pela via L-arginina-NO-GMPc, assim como pela ativação da via de sinalização intracelular da PI3K/mTOR.

O TNF e o TSC são os modelos preditivos para avaliação de atividade antidepressiva mais utilizados para a identificação do potencial de compostos, assim como para investigação dos mecanismos biológicos envolvidos nos efeitos encontrados (Cryan et al., 2002). Nesses testes, o tempo de imobilidade dos animais submetidos a uma situação inescapável é mensurado e um decréscimo no mesmo é considerado como um efeito tipo-antidepressivo (McArthur e Borsini, 2006). Além do fácil uso e boa reprodutibilidade, outro aspecto importante na utilização destes modelos é o fato de ambos serem sensíveis à administração aguda de substância com atividade antidepressiva, permitindo a identificação de novas drogas e compostos em potencial para o tratamento do transtorno (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985; Cryan et al., 2005).

Apesar de drogas que aumentam a atividade motora dos animais poderem produzir resultados falso positivos no TSC, nossos dados demonstraram que o efeito anti-imobilidade da guanosina não pode ser atribuído a um efeito psicoestimulante. Essa conclusão se deve ao fato de que os grupos experimentais que demonstraram um decréscimo significativo no tempo de imobilidade no TSC não tiveram alterações significativas na atividade locomotora mensurada no TCA. Um aspecto importante a ser observado é o fato de que o efeito antidepressivo da guanosina encontrado nos testes ocorreu com a administração por via oral de baixas doses (0,05 mg/kg no TSC e 0,5 mg/kg no TNF) deste nucleosídeo. Investigações de outros efeitos da guanosina in vivo como a ação amnésica, a antinociceptiva, assim como a atividade neuroprotetora contra isquemia mostraram que esses efeitos ocorrem quando a guanosina é administrada em doses mais elevadas. Essas propriedades da guanosina foram observadas numa faixa entre 2 mg/kg a 8mg/kg, entretanto, o efeito antinociceptivo deste nucleosídeo foi observado em doses até 240 mg/kg (Vinadé et al., 2004, Schmidt et

al., 2010; Rathbone et al., 2011). Curiosamente a cetamina, cujo mecanismo de ação também envolve a modulação do sistema glutamatérgico, apresenta esses mesmos efeitos e, da mesma forma, exerce uma ação antidepressiva que ocorre em doses consideradas muito baixas (Babar et al., 2001; Zarate et al., 2006; Romero et al., 2011; Shu et al., 2012).

Estudos apontam a possibilidade de que alterações neuroadaptativas são necessárias para que ocorra o efeito dos antidepressivos monoaminérgicos, o que explicaria o efeito tardio destes fármacos (Skolnick et al., 2009). Essa idéia é suportada por observações de que a administração crônica de antidepressivos (monoaminérgicos, tricíclicos, terapia eletroconvulsiva) regula a expressão e o funcionamento dos receptores NMDA (Paul et al., 1993; Nowak et al., 1993, 1998). Além disso, alguns antagonistas de receptores NMDA demonstram uma ação antidepressiva rápida em estudos pré-clínicos e clínicos (Diazgranados et al., 2010; Li et al., 2010, 2011). O desenvolvimento de antidepressivos de ação rápida representa um avanço significativo para o tratamento da depressão, uma vez que o efeito tardio dos antidepressivos convencionais pode ser um problema sério, principalmente no caso de pacientes com alto risco de suicídio (Price et al., 2009). De fato, altas taxas de morbidade e mortalidade são observadas durante o período de latência que a terapia farmacológica convencional leva para fazer efeito (Machado-Vieira et al., 2008).

Levando em conta a importância dos receptores NMDA na patofisiologia da depressão e no mecanismo de ação dos antidepressivos, o presente estudo investigou o envolvimento desses receptores no efeito antidepressivo da guanosina no TSC. Os resultados demonstraram que o efeito observado no TSC provavelmente envolve uma inibição, possivelmente de forma indireta, dos receptores NMDA, uma vez que o tratamento dos camundongos com NMDA levou a uma reversão do efeito antidepressivo da guanosina no TSC.

Para confirmar essa hipótese, foi investigado o efeito da D-serina sobre a redução no tempo de imobilidade causada pelo tratamento dos animais com guanosina. A D-serina é um co-agonista dos receptores NMDA que atua no sítio da glicina presente nesses receptores e tem um papel na hiperatividade dos mesmos assim como na excitotoxicidade glutamatérgica sendo, conseqüentemente, associada a uma série de distúrbios do SNC (Sasabe et al., 2007, Wu et al., 2007). Em nosso trabalho, a administração de D-serina preveniu o efeito anti-imobilidade da guanosina no TSC, reforçando a idéia de que a ativação dos

receptores NMDA anula o efeito antidepressivo do nucleosídeo neste modelo comportamental. Cabe ressaltar que essa abordagem comportamental se mostrou efetiva em prevenir o efeito tipo-antidepressivo de outros moduladores do sistema glutamatérgico como antagonistas de receptores NMDA (Poleszak et al., 2007), assim como de bloqueadores de sítios específicos desses receptores como o zinco e o magnésio (Poleszak et al., 2008).

Em seguida, o presente estudo investigou o efeito da combinação de doses-sub-ativas dos antagonistas de receptores NMDA, MK-801 ou cetamina, com dose sub-ativa de guanosina no TSC. Os resultados obtidos confirmaram os dados anteriores uma vez que a co-administração de guanosina com ambas as drogas produziu uma redução significativa no tempo de imobilidade dos animais no TSC. A cetamina e o MK-801 demonstram efeito antidepressivo em modelos animais preditivos (Dhir and Kulkarni, 2008; Koike et al., 2011) e ambas as drogas, em doses sub-efetivas causam uma redução significativa no tempo de imobilidade dos animais no TSC ou no TNF, quando combinadas com doses sub-ativas de compostos ou fármacos com atividade antidepressiva (Rogóz et al., 2002; Mantovani et al. 2003; Moretti et al., 2011).

Apesar de tanto a cetamina como o MK-801 serem antagonistas de receptores NMDA e apresentarem propriedades antidepressivas, o efeito prolongado ocasionado pela administração de cetamina não ocorre com a administração de MK-801 (Autry et al., 2011). Levando em conta que estas drogas apresentam meia-vida curta, possivelmente as diferenças na resposta antidepressiva desses agentes se devem à capacidade de induzir e manter a plasticidade sináptica e não ao bloqueio em si desses receptores. Essa hipótese enaltece a necessidade de se investigar o papel das vias de sinalização intracelulares moduladas pelo bloqueio ou ativação dos receptores NMDA na atividade antidepressiva.

A inativação do glutamato após sua função específica como neurotransmissor ter sido concluída é essencial para proteger os neurônios e células gliais de um potencial insulto tóxico. Esses efeitos críticos do glutamato incluem diversos receptores e segundo-mensageiros causando alterações na circuitaria implicadas nos transtornos de humor (Machado-Vieira et al., 2009). Níveis excessivos de glutamato e uma deficiente captação glial desse neurotransmissor são mecanismos em potencial que podem estar contribuindo para a atrofia e perda neuronal que ocorrem na depressão (Krishnan and Nestler, 2008; Sanacora et al. 2008).

Entretanto, apesar de ser bem estabelecido que a guanosina modula o sistema glutamatérgico através da estimulação da captação de glutamato pelos astrócitos (Frizzo et al., 2003, 2005), dados experimentais demonstraram que o nucleosídeo tem pouca capacidade de inibir a ligação do neurotransmissor aos seus receptores (Porciúncula et al., 2002). Uma possibilidade para explicar o envolvimento dos receptores NMDA observado no TSC no presente estudo, pode ser a ocorrência de uma redução na proporção desses receptores em configuração ativa ou aberta causada pela remoção do glutamato da fenda sináptica. Entretanto, novos estudos precisam ser feitos para se confirmar essa hipótese.

O influxo de cálcio ocasionado pela estimulação dos receptores NMDA induz a ativação da NOS no terminal pós-sináptico, ocasionando a síntese de NO a partir de L-arginina (Steinert et al., 2010). O aumento dos níveis de NO está relacionado a processos biológicos associados com a depressão como a morte neuronal induzida por glutamato (Strijbos et al., 1996) e o estresse oxidativo (Bergstrom et al., 2007, Packer et al., 2005). A excitotoxicidade induzida pelo NO pode estar relacionada a uma redução na captação do glutamato pelos astrócitos e a um aumento na ativação de receptores NMDA, levando a um ciclo neuronal vicioso (Strijbos et al., 1996). Foi observado que a exposição de animais ao estresse imprevisível, além de levar a uma série de alterações comportamentais que se assemelham à depressão em humanos, induz a expressão de nNOS em estruturas cerebrais relacionadas ao transtorno como o hipocampo, a amígdala e o córtex (De Oliveira et al., 2000, Oliveira et al., 2008). Adicionalmente, estudos clínicos encontraram níveis elevados de NO em pacientes que realizaram tentativa de suicídio (Kim et al., 2006).

Levando em conta essas informações, o presente estudo investigou também o envolvimento da via L-arginina-NO no efeito antidepressivo da guanosina no TSC. O tratamento dos camundongos com L-arginina (substrato da NOS) foi efetivo em reverter a redução no tempo de imobilidade ocasionada pela guanosina sem alterar a atividade locomotora dos animais. Esses dados sugerem que o efeito anti-imobilidade causado por esse nucleosídeo no TSC possivelmente é mediado pela inibição da síntese de NO. De fato, estudos demonstram que a administração de L-arginina inibe a atividade tipo-antidepressiva de diversos fármacos utilizados no tratamento clínico do transtorno como a imipramina, a venlafaxina e a bupropiona (Harkin et al., 1999; Dhir and Kulkarni, 2007a, b). Da mesma forma, a redução na atividade

da via NMDA-NOS demonstra ter efeito antidepressivo e/ou potencializar a atividade antidepressiva em estudos pré-clínicos (Volke et al., 2003; Harkin et al., 1999, 2004).

O 7-NI é um inibidor preferencial da nNOS que demonstra propriedades antidepressivas em modelos animais assim como facilita a neurogênese e neuroplasticidade hipocampal. (Joca e Guimaraes, 2006; Yildiz et al., 2000). Para verificar se a inibição da nNOS influencia o efeito antidepressivo da guanosina no TSC, o presente trabalho utilizou a co-administração de doses sub-ativas de 7-NI e guanosina. Os resultados obtidos demonstraram uma redução significativa no tempo de imobilidade registrado no teste. Esses dados estão de acordo com a literatura, uma vez que diversos compostos com propriedades antidepressivas demonstraram ter efeitos que são prevenidos pelo aumento nos níveis de NO (Brocardo et al., 2008; Dhir e Kulkarni, 2008; Ghasemi et al., 2009; Zomkowski et al., 2010; Moretti et al., 2011).

Apesar do papel dessa molécula na plasticidade sináptica, o NO é um radical livre que, em níveis elevados, causa danos oxidativos às células (Habib, 2011). Esse tipo de toxicidade está relacionada com diversas desordens do SNC, incluindo a patogênese da depressão induzida pelo estresse (Tsuboi et al., 2006; Sarandol et al., 2007). Curiosamente, estudos demonstram que a exposição dos animais a um estresse agudo ativa cascatas de sinalização que levam a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (Liu et al., 1996; Viswanatha et al., 2011). Além disso, foi demonstrado recentemente que o estresse causado pela submissão dos animais ao TNF, leva a uma alteração na expressão de genes relacionados a resposta ao estresse oxidativo, controle da apoptose e neuroplasticidade no hipocampo. De fato esses processos biológicos estão relacionados tanto com a depressão quanto com os níveis de NO. Cabe ressaltar que a maioria dessas alterações na expressão gênica foram atenuadas pelo tratamento com 7-NI, sugerindo que a inibição da síntese de NO possivelmente tem um efeito antidepressivo que envolve alterações relacionadas ao estresse oxidativo e à neuroplasticidade (Ferreira et al., 2011).

O NO sintetizado a partir da L-arginina é um potente estimulador da enzima GCs, que por sua vez catalisa a conversão de GTP em GMPc, um mediador de muitos efeitos do NO (Snyder, 1992; Denninger e Marletta, 1999). No presente trabalho, os camundongos foram tratados com ODQ, um inibidor da GCs. A administração foi feita em uma dose que *per se* não demonstra uma redução no tempo de imobilidade no TSC, combinada com uma dose sub-ativa de guanosina.

A análise estatística do tempo de imobilidade registrado no TSC demonstrou uma diferença significativa em comparação ao grupo controle ou às drogas administradas isoladamente, caracterizando um efeito antidepressivo no modelo preditivo. Esses dados demonstram que o efeito antidepressivo da guanosina no TSC envolve além do NO, a regulação dos níveis de GMPc por essa molécula.

A concentração intracelular de GMPc também pode ser regulada pela fosfodiesterase (PDE), que por sua vez catalisa a hidrólise dos segundo mensageiros AMPc and GMPc. Sildenafil é um inibidor seletivo da PDE-5, o que faz com que ocorra um aumento nos níveis de GMPc nos tecidos-avulsos (Beavo, 1995). Além disso, uma série de estudos demonstram que a administração de sildenafil reverte a atividade antidepressiva de diversos compostos em modelos preditivos (Kaster et al., 2005; Brocardo et al., 2008; Dhir and Kulkarni, 2008; Moretti et al., 2011). Dessa forma, outra evidência de que o efeito antidepressivo da guanosina no TSC envolve um decréscimo nos níveis de GMPc é observada no resultado experimental que demonstra que o tratamento dos camundongos com sildenafil preveniu o efeito antidepressivo da guanosina no TSC.

Sabe-se que tanto o NO como o GMPc podem ativar diferentes tipo de canais de K^+ (Taniguchi et al. 1993; Bolotina et al. 1994; Jeong et al. 2001). A abertura desses canais leva a uma hiperpolarização da membrana celular, resultando num decréscimo na excitabilidade neuronal (Mackinnon 2003). Evidências apontam para a possibilidade de que uma via comum no efeito de antidepressivos convencionais possa ser a modulação da excitabilidade neuronal através da inibição desses canais (Tytgat et al. 1997; Kobayashi et al. 2003; Bortolatto et al., 2010). Em modelos pré-clínicos, a administração de diversos inibidores de canais de K^+ demonstrou atividade antidepressiva e, da mesma forma, ativadores desses canais promoveram um efeito depressiogênico (Redrobe et al., 1996; Galeotti et al., 1999). Além disso, evidências apontam que a inibição desses canais está envolvida na atividade antidepressiva de uma série de compostos em modelos comportamentais (Kaster et al., 2007; Budni et al., 2007; Wilhelm et al., 2010). Entretanto, novos estudos são necessários para se confirmar o envolvimento desses canais no efeito antidepressivo da guanosina no TSC.

Além da via L-arginina-NO-GMPc, a redução na atividade dos receptores NMDA também pode causar alterações neuroquímicas que vão levar a uma série de eventos que modulam a neuroplasticidade. A

plasticidade sináptica é a habilidade de processar informações de outras aferências neuronais, estocar essa informação e gerar futuras respostas adaptativas. Cabe ressaltar que o aumento na sinaptogênese é tipicamente acompanhado por um aumento no número de espinhas dendríticas (Holtmaat e Svoboda, 2009; Yoshihara et al., 2009; Duman et al., 2012). Diversos estudos suportam a idéia do envolvimento das espinhas dendríticas no transtorno depressivo. A exposição ao estresse causa a atrofia de neurônios localizados em regiões intimamente implicadas com a depressão como o córtex pré-frontal e o hipocampo (McEwen, 2008; Shansky e Morrison, 2009). Essa atrofia inclui um decréscimo tanto no número quanto no tamanho das espinhas dendríticas, contribuindo para a redução no volume dessas estruturas cerebrais (Drevets e Furey, 2010; Macqueen et al., 2008).

A administração dos antagonistas de receptores NMDA, cetamina e Ro 25-6981, revertem agudamente tanto o déficit nas espinhas dendríticas quanto as alterações comportamentais causadas pela exposição de ratos ao estresse crônico. Cabe ressaltar que esse modelo comportamental só é responsivo ao tratamento crônico com antidepressivos convencionais. (Li et al., 2011). Esse efeito rápido sobre a morfologia das espinhas sinápticas assim como sobre o comportamento dos animais é anulado na presença de inibidores da via da PI3K/Akt e da mTOR (Li et al., 2010; Duman et al., 2012).

As PI3Ks são enzimas que iniciam cascatas de sinalização que desempenham um papel crítico em uma variedade de processos celulares, sendo principalmente associadas com o crescimento e a sobrevivência (Kennedy et al. 1997). Apesar de um grande número de efetores da PI3K ter sido identificado, diversos estudos demonstram que os efeitos sobre a sobrevivência celular ocorrem através da proteína Akt (Toker 2000; Sutton e Chandler, 2002). A ativação da via da PI3K/Akt é mediada pela atividade de diversos receptores e está relacionada com o crescimento de neuritos, plasticidade sináptica e efeito antidepressivo induzidos pela inativação de receptores NMDA e pela ativação de receptores de neurotrofinas, principalmente o BDNF (Kelly and Lynch, 2000; Chao et al., 2006; Chen et al., 2008; Yang et al., 2008). Além disso, foi observada uma diminuição na expressão e na atividade da PI3K em pacientes que cometeram suicídio (Dwivedi et al., 2008). Levando em conta o envolvimento dessa via na depressão, o presente trabalho investigou também o papel da PI3K no efeito antidepressivo da guanosina no TSC.

O tratamento dos animais com LY294002, inibidor reverssível da PI3K, foi efetivo em reverter a redução no tempo de imobilidade

causada pela administração de dose ativa de guanosina no TSC. Da mesma forma, os camundongos tratados com wortmanina, inibidor irreversível da PI3K, juntamente com dose ativa de guanosina, não demonstraram efeito anti-imobilidade no TSC. A análise dos dados sugere o envolvimento da PI3K no efeito antidepressivo exercido pela guanosina neste modelo comportamental. Os resultados do presente trabalho são similares a outros estudos com a guanosina, uma vez que diversos trabalhos constataram que essa via é essencial para a atividade neuroprotetora da guanosina contra vários tipos de insulto (Di Iorio et al., 2004; D'Alimonte et al., 2007; Pettifer et al., 2007; Oleskovicz et al., 2008; Tarozzi et al., 2010; Dal-Cim et al., 2011).

Por fim, foi investigado o envolvimento da mTOR no efeito tipo-antidepressivo da guanosina no TSC através do tratamento dos animais com um inibidor da atividade dessa proteína. Os animais tratados com rapamicina não apresentaram a redução significativa no tempo de imobilidade ocasionada pelo tratamento com guanosina no TSC, indicando o envolvimento dessa via no efeito encontrado.

A rapamicina é um derivado de bactérias encontradas no solo da Ilha de Páscoa (Rapa Nui) que possui propriedade antiproliferativa através da inibição da atividade da mTOR (Vézina et al., 1975; Benjamin et al., 2011). A mTOR exerce seus efeitos sobre a proliferação celular a partir da formação de um complexo chamado mTORC1. Um dos principais substratos da ativação desse complexo é a proteína ribossomal S6 cinase (S6K) que, por sua vez, controla diversos aspectos da síntese protéica como a regulação da biossíntese da subunidade ribossomal S6 (Hoeffler e Klann, 2010). A estimulação da síntese protéica pela mTOR, eleva os níveis de proteínas associadas ao funcionamento sináptico como a sinapsina-1, a proteína de densidade pós-sináptica (PSD95) e a GluR1, levando ao aumento no número de espinhas dendríticas e ao comportamento antidepressivo (Li et al., 2011; Duman et al., 2012).

Sendo assim, possivelmente a guanosina através de seus efeitos modulatórios sobre o sistema glutamatérgico, esteja afetando a atividade dos receptores NMDA e, conseqüentemente as vias do NO-GMPc e da PI3K/Akt/mTOR, produzindo o comportamento tipo-antidepressivo observado no TSC.

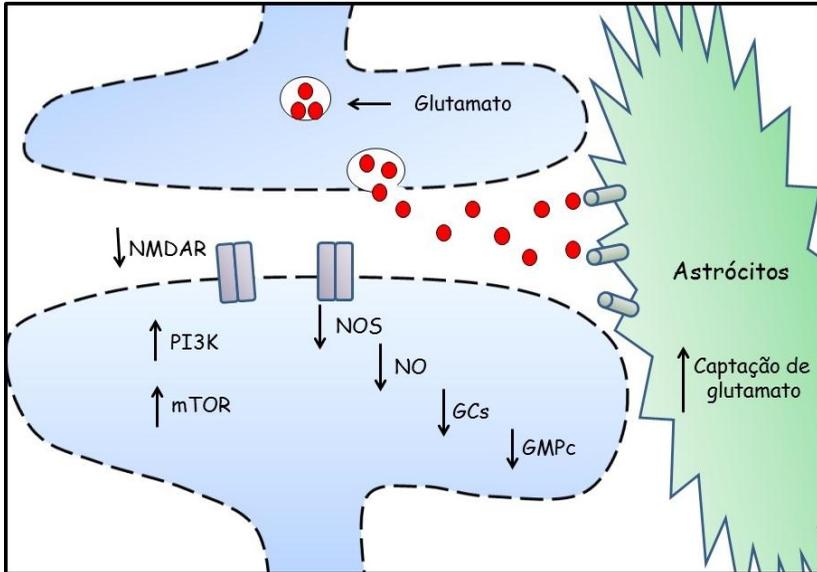


Figura 20. Possíveis mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo da administração aguda de guanosina no TSC. A guanosina parece reduzir a atividade de receptores NMDA, possivelmente através da redução dos níveis de glutamato na fenda ocasionada pela estimulação da captação deste neurotransmissor pelos astrócitos. Seu efeito também é dependente da diminuição dos níveis de NO e GMPc no neurônio, ocasionada pela atividade reduzida dos receptores NMDA. Além disso, um aumento na atividade das proteínas PI3K e mTOR parece ser essencial para que ocorra o efeito observado no TSC.

CONCLUSÕES

√ A administração aguda de baixas doses de guanosina por via oral produz um efeito tipo-antidepressivo no TNF e no TSC sem alterar a atividade locomotora dos animais no TCA.

√ O efeito antidepressivo da guanosina no TSC foi revertido pela ativação dos receptores NMDA.

√ A guanosina produziu um efeito antidepressivo no TSC em dose sub-ativa quando combinada com doses sub-ativas de antagonistas de receptores NMDA.

√ A redução no tempo de imobilidade dos animais ocasionada pela administração de guanosina foi revertida pelo aumento nos níveis de NO.

√ O tratamento dos animais com dose sub-ativa de guanosina combinada com dose sub-ativa de inibidor da GCs demonstrou um efeito antidepressivo no TSC.

√ O aumento nos níveis de GMPc anulou o efeito antidepressivo da guanosina no TSC.

√ A inibição da PI3K e da mTOR reverteram o efeito antidepressivo ocasionado pela administração de guanosina no TSC.

PERSPECTIVAS

- Investigar o envolvimento do sistema adenosinérgico, dos canais de K^+ e dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no efeito tipo-antidepressivo da guanosina.
- Investigar o envolvimento de outras vias de sinalização intracelular no efeito tipo-antidepressivo da guanosina como as MAPKs e a GSK-3 β .
- Avaliar as alterações nos níveis do NGF, FGF-2, VEGF e BDNF no córtex e hipocampo de camundongos tratados com guanosina.
- Verificar o efeito da administração de guanosina sobre parâmetros oxidativos como a glutationa-S-transferase, catalase e superóxido dismutase, assim como a relação GSH/GSSG e a peroxidação lipídica pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Investigar o papel da guanosina sobre a expressão e atividade de proteínas sinápticas como a sinapsina-1, a PSD95 e GluR1.

REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G. Purinergic signaling: Pathophysiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.*, v. 78, p. 113-145, 1998.

ALMEIDA R.C., FELISBINO C.S., LÓPEZ M.G., RODRIGUES A.L., GABILAN N.H. Evidence for the involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. *Behav. Brain Res.*, v. 168, p. 318-322, 2006.

ALT A., NISENBAUM E.S., BLEAKMAN D., WITKIN J.M. A role for AMPA receptors in mood disorders. *Biochem. Pharmacol.*, v. 71, p. 1273-1288, 2006.

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

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

AUTRY A.E., ADACHI M., NOSYREVA E., NA E.S., LOS M.F., CHENG P.F., KAVALALI E.T., MONTEGGIA L.M. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, v. 475, p. 91-95, 2011.

BABAR E., OZGÜNEN T., MELIK E., POLAT S., AKMAN H. Effects of ketamine on different types of anxiety/fear and related memory in rats with lesions of the median raphe nucleus. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 431, p. 315-320, 2001.

BANASR M., CHOWDHURY G.M., TERWILLIGER R., NEWTON S.S., DUMAN R.S., BEHAR K.L., SANACORA G. 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, p. 501-511, 2010.

BANASR M., DUMAN R.S. Glial loss in the prefrontal cortex is sufficient to induce depressive-like behaviors. *Biol. Psychiatry*, v. 64, p. 863-870, 2008.

BAU C., MIDDLEMISS P.J., HINDLEY S., JIANG S., CICCARELLI R., CACIAGLI F., DI IORIO P., WERSTIUK E.S., RATHBONE M.P. Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. *Purinergic Signal.*, v. 1, p. 161-172, 2005.

BAUNE B.T., ADRIAN I., JACOBI F. Medical disorders affect health outcome and general functioning depending on comorbid major depression in the general population. *J. Psychosom. Res.*, v. 62, p. 109-118, 2007.

BEAVO J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.*, v. 75, p. 725-748, 1995.

BENJAMIN D., COLOMBI M., MORONI C., HALL M.N. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 10, p. 868-880, 2011.

BERGSTROM A., JAYATISSA M.N., THYKJAER T., WIBORG O. Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression: a gene expression study. *J. Mol. Neurosci.*, v. 33, p. 201-215, 2007.

BERMAN R.M., CAPIELLO A., ANAND A., OREN D.A., HENINGER G.R., CHARNEY D.S., KRYSTAL J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry*, v. 47, p. 351-354, 2000.

BERROCOSO E., ROJAS-CORRALES M.O., MICÓ J.A. Non-selective opioid receptor antagonism of the antidepressant-like of venlafaxine in the forced swimming test in mice. *Neurosci. Lett.*, v. 363, p. 25-28, 2004.

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

BOLOTINA V.M., NAJIBI S., PALACINO J.J., PAGANO P.J., COHEN R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, v. 368, p. 850-853, 1994.

BONANNO G., GIAMBELLI R., RAITERI L., TIRABOSCHI E., ZAPPETTINI S., MUSAZZI L., RAITERI M., RACAGNI G., POPOLI M. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J. Neurosci.*, v. 25, p. 3270-3279, 2005.

BORTOLATTO C.F., JESSE C.R., WILHELM E.A., NOGUEIRA C.W. Involvement of potassium channels in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Life Sci.*, v. 86, p. 372-376, 2010.

BOURNE, H.R., SANDERS D.A., McCORMICK, F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, v. 348, p. 125-131, 1990.

BRAMBILLA P., PEREZ J., BARALE F., SCHETTINI G., SOARES J.C. GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol. Psychiatry*, v. 8, p. 721-737, 2003.

BROCARDO P.S., BUDNI J., LOBATO K.R., KASTER M.P., RODRIGUES A.L. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 598, p. 37-42, 2008.

BUDNI J., GADOTTI V.M., KASTER M.P., SANTOS A.R., RODRIGUES A.L. Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of agmatine in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 575, p. 87-93, 2007.

BUDNI J., LOBATO K.R., BINFARÉ R.W., FREITAS A.E., COSTA A.P., SAAVEDRA M.D., LEAL R.B., LOPEZ M.G., RODRIGUES A.L. Involvement of PI3K, GSK-3 β and PPAR γ in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *J. Psychopharmacol.*, 2011, doi:10.1177/0269881111424456.

BURNSTOCK G., COCKS T., CROWE R., KASAKOV L. Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.*, v. 63, p. 125-138, 1978.

BURNSTOCK G., KRÜGEL U., ABBRACCHIO M.P., ILLES P. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.*, v. 95, p. 229-274, 2011.

CACIAGLI F., DI IORIO P., GIULIANI P., MIDDLEMISS P.J., RATHBONE M.P. The neuroprotective activity of guanosine involves the production of trophic factors and the outflow of purines from astrocytes. *Drug Dev. Res.*, v. 50, p. 32, 2000.

CARDOSO C.C., LOBATO K.R., BINFARÉ R.W., FERREIRA P.K., ROSA A.O., SANTOS A.R., RODRIGUES A.L. Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of magnesium. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 33, p. 235-242, 2008.

CASTRÉN E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 4, p. 58-64, 2004.

CHAO M.V., RAJAGOPAL R., LEE F.S. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin. Sci. (Lond.)*, v. 110, p. 167-173, 2006.

CHEN B., DOWLATSHAHI D., MACQUEEN G.M., WANG J.F., YOUNG L.T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry*, v. 50, p. 260-265, 2001.

CHEN Y., HERTZ L., RATHBONE M.P., CODE W. Adenosine and guanosine increase free cytosolic calcium concentration in mouse brain astrocytes through different receptors. *Abstr. Soc. Neurosci.*, v. 19, p. 687, 1993.

CHEN Z.Y., BATH K., McEWEN B., HEMPSTEAD B., LEE F. Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Found. Symp.*, v. 289, p. 180-188, 2008.

CICCARELLI R., BALLERINI P., SABATINO G., RATHBONE M.P., D'ONOFRIO M., CACIAGLI F., DI IORIO P. Involvement of

astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 19, p. 395-414, 2001.

CICCARELLI R., DI IORIO P., D'ALIMONTE I., GIULIANI P., FLORIO T., CACIAGLI F., MIDDLEMISS P.J., RATHBONE M.P. Cultured astrocytes proliferation induced by extracellular guanosine involves endogenous adenosine and is raised by the co-presence of microglia. *Glia*, v. 29, p. 202-211, 2000.

CICCARELLI R., DI IORIO P., GIULIANI P., D'ALIMONTE I., BALLERINI P., CACIAGLI F., RATHBONE M.P. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia*, v. 25, p. 93-98, 1999.

COTTER D.R., PARIANTE C.M., EVERALL I.P. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: The evidence and implications. *Brain Res. Bull.*, v. 55, p. 585-595, 2001.

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

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

CRYAN J.F., MOMBÉREAU C., VASSOUT A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 29, p. 571-625, 2005.

CUNHA M.P., MACHADO D.G., BETTIO L.E., CAPRA J.C., RODRIGUES A.L. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 32, p. 1913-1920, 2008.

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

D'ALIMONTE I., FLATI V., D'AURO M., TONIATO E., MARTINOTTI S., RATHBONE M.P., JIANG S., BALLERINI P., DI IORIO P., CACIAGLI F., CICCARELLI R. Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells. *J. Immunol.*, v. 178, p. 720-31, 2007.

DA SILVA G.L., MATTEUSSI A.S., SANTOS A.R., CALIXTO J.B., RODRIGUES A.L.S. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *NeuroReport*, v. 11, p. 3699-3702, 2000.

DAL-CIM T., MARTINS W.C., SANTOS A.R., TASCA C.I. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience*, v. 183, p. 212-220, 2011.

DANBOLT N.C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, v. 65, p. 1-105, 2001.

DE OLIVEIRA R.M., APARECIDA DEL BEL E., MAMEDE-ROSA M.L., PADOVAN C.M., DEAKIN J.F., GUIMARAES F.S. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. *Neurosci. Lett.*, v. 289, p. 123-126, 2000.

DELGADO P.L., CHARNEY D.S., PRICE L.H., LANDIS H., HENINGER G.R. Monoamines and the mechanism of antidepressant action: effects of catecholamine depletion on mood of patients treated with antidepressants. *Psychopharmacol. Bull.*, v. 29, p. 389-396, 1993.

DHIR A., KULKARNI S.K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 568, p. 177-185, 2007a.

DHIR A., KULKARNI S.K. Involvement of l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 31, p. 921-925, 2007b.

DHIR A., KULKARNI S.K. Possible involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant-like effect of MK-

801(dizocilpine), a NMDA receptor antagonist in mouse forced swim test. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 46, p. 164-70, 2008.

DHIR A., KULKARNI S.K. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide*, v. 24, p. 125-131, 2011.

DI IORIO P., BALLERINI P., TRAVERSA U., NICOLETTI F., D'ALIMONTE I., KLEYWEGT S., WERSTIUK E.S., RATHBONE M.P., CACIAGLI F., CICCARELLI R. The antiapoptotic effect of guanosine is mediated by the activation of the PI 3-kinase/AKT/PKB pathway in cultured rat astrocytes. *Glia*, v. 46, p. 356-368, 2004.

DI IORIO P., CACIAGLI F., GIULIANI P., BALLERINI P., CICCARELLI R., SPERLING O., ZOREF-SHANI E., BENOWITZ L., TRAVERSA U., BOMBI G., FLORIO T., VIRGILIO A., ANDREW C.M., CROCKER C.E., WERSTIUK E.S., MIDDLEMISS P., RATHBONE M.P. Purine nucleosides protect injured neurons and stimulate neuronal regeneration by intracellular and membrane receptor-mediated mechanisms. *Drug Dev. Res.*, v. 52, p. 303-315, 2001.

DIAZGRANADOS N., IBRAHIM L.A., BRUTSCHE N.E., AMELI R., HENTER I.D., LUCKENBAUGH D.A., MACHADO-VIEIRA R., ZARATE C.A. Jr. Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry*, v. 71, p. 1605-1611, 2010.

DRANOVSKY A., HEN R. Hippocampal Neurogenesis: Regulation by Stress and Antidepressants. *Biol. Psychiatry*, v. 59, p. 1136-1143, 2006.

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

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

DREVETS W.C., VIDEEN T.O., PRICE J.L., PRESKORN S.H., CARMICHAEL S.T., RAICHLER M.E. A functional anatomical study of unipolar depression. *J. Neurosci.*, v. 12, p. 3628-3641, 1992.

DUMAN R.S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med.*, v. 5, p. 11-25, 2004.

DUMAN R.S., LI N., LIU R.J., DURIC V., AGHAJANIAN G. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology*, v. 62, p. 35-41, 2012.

DUMAN R.S., MONTEGGIA L.M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol. Psychiatry*, v. 59, p. 1116-1127, 2006.

DWIVEDI Y., RIZAVI H.S., TEPPEN T., ZHANG H., MONDAL A., ROBERTS R.C., CONLEY R.R., PANDEY G.N. 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, p. 2324-2340, 2008.

ECKELI A.L., DACH F., RODRIGUES A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. *Neuroreport*, v. 11, p. 1839-1843, 2000.

ESPLUGUES J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol.*, v. 135, p. 1079-1095, 2002.

FERREIRA F.R., OLIVEIRA A.M., DINARTE A.R., PINHEIRO D.G., GREENE L.J., SILVA W.A. Jr, JOCA S.R., GUIMARÃES F.S. Changes in hippocampal gene expression by 7-nitroindazole in rats submitted to forced swimming stress. *Genes Brain Behav.*, In press, doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00757.x., 2011.

FINKEL M.S., LAGHRISSE-THODE F., POLLOCK B.G., RONG J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacology Bull.*, v. 32, p. 653-658, 1996.

FLEMING J.J., ENGLAND P.M. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. *Nat. Chem. Biol.*, v. 6, p. 89-97, 2010.

FOURNIER N.M., DUMAN R.S. Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: Implications for the pathophysiology and treatment of depression. *Behav. Brain Res.*, In press, doi:10.1016/j.bbr.2011.04.022, 2011.

FREDHOLM B.B., VERNET L. Release of [3H]-nucleotides from [3H]-adenine labelled hypothalamic synaptosomes. *Acta Physiol. Scand.*, v. 116, p. 285-295, 1979.

FRIZZO M.E., ANTUNES SOARES F.A., DALL'ONDER L.P., LARA D.R., SWANSON R.A., SOUZA D.O. Extracellular conversion of guanine-based purines to guanosine specifically enhances astrocyte glutamate uptake. *Brain Res.*, v. 972, p. 84-89, 2003.

FRIZZO M.E., LARA D.R., DAHM K.C., PROKOPIUK A.S., SWANSON R.A., SOUZA D.O. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures. *Neuroreport*, v. 12, p. 879-881, 2001.

FRIZZO M.E., LARA D.R., PROKOPIUK A.S., VARGAS C.R., SALBEGO C.G., WAINER M., SOUZA D.O. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 22, p. 353-363, 2002.

FRIZZO M.E., SCHWALM F.D., FRIZZO J.K., SOARES F.A., SOUZA D.O. Guanosine enhances glutamate transport capacity in brain cortical slices. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 25, p. 913-921, 2005.

GALEOTTI, N., GHELARDINI, C., CALDARI, B., BARTOLINI, A. Effect of potassium channel modulators in mouse forced swimming test. *Br. J. Pharmacol.*, v. 126, p. 1653-1659, 1999.

GARTHWAITE J., BOULTON C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, p. 683-706, 1995.

GHASEMI M., MONTASER-KOUHSARI L., SHAFAROODI H., NEZAMI B.G., EBRAHIMI F., DEHPOUR A.R. NMDA receptor/nitergic system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 206, p. 325-333, 2009.

GUDERMANN T., SCHORNEBERG T., SCHULTZ G. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 20, p. 399-427, 1997.

GUIX F.X., URIBESALGO I., COMA M., MUÑOZ F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.*, v. 76, p. 126-152, 2005.

GYSBERS J.W., GUARNIERI S., MARIGGIÒ M.A., PIETRANGELO T., FANÒ G., RATHBONE M.P. Extracellular guanosine 5` triphosphate enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth via increases in intracellular calcium. *Neuroscience*, v. 96, p. 817-824, 2000.

GYSBERS J.W., RATHBONE M.P. GTP and guanosine synergistically enhance NGF-induced neurite outgrowth from PC12 cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 14, p. 19-34, 1996.

HABIB S., ALI A. Biochemistry of nitric oxide. *Indian J. Clin. Biochem.*, v. 26, p. 3-17, 2011.

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

HARKIN A.J., CONNOR T.J., WALSH M., JOHN S.T.N., KELLY J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. *Neuropharmacol.*, v. 44, p. 616-623, 2003.

HASHIMOTO K. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 35, p. 1558-1568, 2011.

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

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

IZQUIERDO I., QUILLFELDT J.A., ZANATTA M.S., QUEVEDO J., SCHAEFFER E., SCHMITZ P.K., Medina J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur. J. Neurosci.*, v. 9, p. 786-793, 1997.

JAROSIK J., LEGUTKO B., WERNER S., UNSICKER K., VON BOHLEN UND HALBACH O. Roles of exogenous and endogenous FGF-2 in animal models of depression. *Restor. Neurol. Neurosci.*, v. 29, p. 153-165, 2011.

JERNIGAN C.S., GOSWAMI D.B., AUSTIN M.C., IYO A.H., CHANDRAN A., STOCKMEIER C.A., KAROLEWICZ B. The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, v. 35, p. 1774-1779, 2011.

JEONG S.Y., HA T.S., PARK C.S., UHM D.Y., CHUNG S. Nitric oxide directly activates large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (tSlo). *Moll. Cells*, v. 12, p. 97-102, 2001.

JIANG S., BENDJELLOUL F., BALLERINI P., D'ALIMONTE I., NARGI E., JIANG C., HUANG X., RATHBONE M.P. Guanosine reduces apoptosis and inflammation associated with restoration of function in rats with acute spinal cord injury. *Purinergic Signal.*, v. 3, p. 411-421, 2007.

JIANG S., FISCHIONE G., GIULIANI P., ROMANO S., CACIAGLI F., DI IORIO P. Metabolism and distribution of guanosine given intraperitoneally: implications for spinal cord injury. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.*, v. 27, p. 673-680, 2008.

JIANG S., KHAN M.I., LU Y., WANG J., BUTTIGIEG J., WERSTIUK E.S., CICCARELLI R., CACIAGLI F., RATHBONE M.P. Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. *Neuroreport*, v. 14, p. 2463-2467, 2003.

JIANG S., ZAVITZ C.C., WANG J., SARAF A., ZIELINSKI R., RAMSBOTTOM J.D., BALLERINI P., D'ALIMONTE I., ROMANO S., FISCHIONE G., TRAVERSA U., WERSTIUK E.S., RATHBONE M.P. Non-adenine based purines accelerate wound healing. *Purinergic Signal.*, v. 2, p. 651-661, 2006.

JOCA S.R., FERREIRA F.R., GUIMARAES F.S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitregeric neurotransmitter systems. *Stress*, v. 10, p. 227-249, 2007.

JOCA S.R., GUIMARÃES F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 185, p. 298-305, 2006.

KAREGE F., VAUDAN G., SCHWALD M., PERROUD N., LA HARPE R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, v. 136, p. 29-37, 2005.

KASTER M.P., BUDNI J., BINFARÉ R.W., SANTOS A.R.S., RODRIGUES A.L.S. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 31, p. 690-696, 2007.

KASTER M.P., ROSA A.O., SANTOS A.R., RODRIGUES A.L. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v. 8, p. 601-606, 2005.

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

KENNEDY S.G., WAGNER A.J., CONZEN S.D., JORDAN J., BELLACOSA A., TSICHLIS P.N., HAY N. (1997) The PI 3-

kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.*, v. 11, p. 701-713, 1997.

KIEFER G., FISCHER W., FEUERSTEIN T.J. Effects of amitriptyline, amitriptylinoxide, doxepine and clozapine on N-methyl-D-aspartate-evoked release of [3H]-acetylcholine in rat caudatoputamen. *Arzneimittelforschung*, v. 49, p. 820-823, 1999.

KIM Y.K., PAIK J.W., LEE S.W., YOON D., HAN C., LEE B.H. Increased plasma nitric oxide level associated with suicide attempt in depressive patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 30, p. 1091-1096, 2006.

KOBAYASHI T., WASHIYAMA K., IKEDA K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by the antidepressant paroxetine. *J. Pharmacol. Sci.*, v. 102, p. 278-287, 2006.

KODAMA M., RUSSELL D.S., DUMAN R.S. Electroconvulsive seizures increase the expression of MAP kinase phosphatases in limbic regions of rat brain. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, p. 360-371, 2005.

KRASS M., WEGENER G., VASAR E., VOLKE V. The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. *Behav. Brain Res.*, v. 218, p. 57-63, 2011.

KRISHNAN V., NESTLER E.J. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am. J. Psychiatry.*, v. 167, p. 1305-1320, 2010.

KHOVRIAKOV A.V., PODREZOVA E.P., KRUGLIAKOV P.P., SHIKHANOV N.P., BALYKOVA M.N., SEMIBRATOVA N.V., SOSUNOV A.A., McKHANN I.I. G., AIRAPETIANTS M.G. Participation of NO-synthase system in the stress-mediated reactions of the brain. *Morfologiya*, v. 135, p. 7-11, 2009.

KUGAYA A., SANACORA G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr.*, v. 10, p. 808-819, 2005.

LARA D.R., SCHMIDT A.P., FRIZZO M.E., BURGOS J.S., RAMÍREZ G., SOUZA D.O. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res.*, v. 912, p. 176-180, 2001.

LEE B.H., LEE S.W., YOON D., LEE H.J., YANG J.C., SHIM S.H., KIM D.H., RYU S.H., HAN C., KIM Y.K. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. *Neuropsychobiology*, v. 53, p. 127-132, 2006.

LEE H.K., KIRKWOOD A. AMPA receptor regulation during synaptic plasticity in hippocampus and neocortex. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, v. 22, p. 514-520, 2011.

LI N., LEE B., LIU R.J., BANASR M., DWYER J.M., IWATA M., LI X.Y., AGHAJANIAN G., DUMAN R.S. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, v. 329, p. 959-964, 2010.

LI N., LIU R.J., DWYER J.M., BANASR M., LEE B., SON H., LI X.Y., AGHAJANIAN G., DUMAN R.S. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol. Psychiatry.*, v. 69, p. 754-761, 2011.

LIEBRENZ M., BORGEAT A., LEISINGER R., STOHLER R. Intravenous ketamine therapy in a patient with a treatment-resistant major depression. *Swiss. Med. Wkly.*, v. 137, p. 234-236, 2007.

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

LINDHOLM J.S., AUTIO H., VESA L., ANTILA H., LINDEMANN L., HOENER M.C., SKOLNICK P., RANTAMÄKI T., CASTRÉN E. The antidepressant-like effects of glutamatergic drugs ketamine and AMPA receptor potentiator LY 451646 are preserved in *bdnf*^{+/-} heterozygous null mice. *Neuropharmacology.*, v. 62, p. 391-397, 2011.

LIU J., WANG X., SHIGENAGA M.K., YEO H.C., MORI A., AMES B.N. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J.*, v. 10, p. 1532-1538, 1996.

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

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

LUCKI I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol.*, v. 8, p. 523-532, 1997.

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

MACHADO-VIEIRA R., SALVADORE G., LUCKENBAUGH D.A., MANJI H.K., ZARATE C.A. Jr. Rapid onset of antidepressant action: a new paradigm in the research and treatment of major depressive disorder. *J. Clin. Psychiatry*, v. 69, p. 946-958, 2008.

MACKINNON R. Potassium channels, *FEBS Lett.*, v. 555, p. 62-65, 2003.

MACQUEEN G., YUCEL K., TAYLOR V.H., MACDONALD K., JOFFE R. Posterior hippocampal volumes are associated with remission rates in patients with major depressive disorder. *Biol. Psych.*, v. 64, p. 880-883, 2008.

MAENG S., ZARATE C.A. Jr., DU J., SCHLOESSER R.J., McCAMMON J., CHEN G., MANJI H.K. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol. Psychiatry*, v. 63, p. 349-352, 2008.

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

MAGARINOS A.M., McEWEN B.S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience*, v. 69, p. 89-98, 1995.

MANTOVANI M., PÉRTILE R., CALIXTO J.B., SANTOS A.R.S., RODRIGUES A.L.S. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci. Let.*, v. 343, p. 1-4, 2003.

MAURI M.C., FERRARA A., BOSCATI L., BRAVIN S., ZAMBERLAN F., ALECCI M., INVERNIZZI G. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. *Neuropsychobiology*, v. 37, p. 124-129, 1998.

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

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

McENTEE W.J., CROOK T.H. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 111, p. 391-401, 1993.

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

MELDRUM B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *J. Nutr.*, v. 130, p. 1007S-1015S, 2000.

MERCIER G., LENNON A.M., RENOUF B., DESSOUROUX A., RAMAUGÉ M., COURTIN F., PIERRE M. MAP kinase activation by fluoxetine and its relation to gene expression in cultured rat astrocytes. *J. Mol. Neurosci.*, v. 24, p. 207-216, 2004.

MITANI H., SHIRAYAMA Y., YAMADA T., MAEDA K., ASHBY Jr. C.R., KAWAHARA R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 30, p. 1155-1158, 2006.

MOLZ S., DAL-CIM T., BUDNI J., MARTÍN-DE-SAAVEDRA M.D., EGEA J., ROMERO A., DEL BARRIO L., RODRIGUES A.L., LÓPEZ M.G., TASCA C.I. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 β pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. *J. Neurosci. Res.*, v. 89, p. 1400-1408, 2011.

MONCADA S. Nitric oxide. *J. Hypertens. Suppl.*, v. 12, p. 35-39, 1994.

MORETTI M., FREITAS A.E., BUDNI J., FERNANDES S.C., BALEN Gde O, RODRIGUES AL. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. *Behav. Brain Res.*, v. 225, p. 328-333, 2011.

MORGAN C.J., CURRAN H.V. Ketamine use: a review. *Addiction*, v. 107, p. 27-38, 2012.

MORILAK D.A., FRAZER A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v. 7, p. 193-218, 2004.

MÜLLER C.E., SCIOR T. Adenosine receptors and their modulators. *Pharm. Acta Helv.*, v. 68, p. 77-111, 1993.

MURRAY C.J., LOPEZ A.D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet*, v. 349, p. 1436-1442, 1997.

MUSSELMAN, D.L., EVANS, D.L., NEMEROFF, C.B. The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology and treatment. *Arch. Gen. Psych.*, v. 55, p. 580-592, 1998.

NARDI A.E. Depressão no Ciclo da Vida. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, v. 22, p. 151-152, 2000.

NEARY J.T., RATHBONE M.P., CATTABENI F., ABBRACCHIO M.P., BURNSTOCK G. Trophic actions of extracellular nucleotides and nucleosides on glial and neuronal cells. *Trends Neurosci.*, v. 19, p. 13-18, 1996.

NESTLER E.J., BARROT M., DILEONE R.J., EISCH A.J., GOLD S.J., MONTEGGIA L.M. Neurobiology of depression. *Neuron*, v. 34, p. 13-25, 2002.

NESTLER E.J., CARLEZON W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol. Psychiatry*, v. 59, p. 1151-1159, 2006.

NGO L.Y., PATIL S.D., UNADKAT J.D. Ontogenic and longitudinal activity of a(+)-nucleoside transporters in the human intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 280, p. 475-481, 2001.

NOWAK G., SZEWCZYK B., PILC A. Zinc and depression. An update. *Pharmacol. Rep.*, v. 57, 713-718, 2005.

OLESKOVICZ S.P., MARTINS W.C., LEAL R.B., TASCA C.I. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem. Int.*, v. 52, p. 411-418, 2008.

OLIVEIRA R.M., GUIMARAES F.S., DEAKIN J.F. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 41, p. 333-341, 2008.

OZAWA S., KAMIYA H., TSUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, v. 54, p. 581-618, 1998.

PAAS Y., DEVILLERS-THIERY A., CHANGEUX J.P., MEDEVIELLE F., TEICHBERG V.I. (1996). Identification of an extracellular motif involved in the binding of guanine nucleotides by a glutamate receptor. *EMBO J.*, v. 15, p. 1548-1556, 1996.

PACKER M.A., HEMISH J., MIGNONE J.L., JOHN S., PUGACH I., ENIKOLOPOV G. Transgenic mice overexpressing nNOS in the adult nervous system. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, v. 51, p. 269-277, 2005.

PARK S.E., DANTZER R., KELLEY K.W., McCUSKER R.H. Central administration of insulin-like growth factor-I decreases depressive-like behavior and brain cytokine expression in mice. *J. Neuroinflammation.*, v. 8, p. 12, 2011.

PAUL I.A., NOWAK G., LAYER R.T., POPIK P., SKOLNICK P. Adaptation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex following chronic antidepressant treatments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 269, p. 95-102, 1994.

PAUL I.A., SKOLNICK P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1003, p. 250-272, 2003.

PETTIFER K.M., JIANG S., BAU C., BALLERINI P., D'ALIMONTE I., WERSTIUK E.S., RATHBONE M.P. MPP(+)-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. *Purinergic Signal.*, v. 3, p. 399-409, 2007.

PETTIFER K.M., KLEYWEGT S., BAU C.J., RAMSBOTTOM J.D., VERTES E., CICCARELLI R., CACIAGLI F., WERSTIUK E.S., RATHBONE M.P. Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced apoptosis. *Neuroreport*, v. 15, p. 833-836, 2004.

PITTERNGER C., DUMAN R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, p. 88-109, 2008.

POLESZAK E., WLAZ P., WRÓBEL A., DYBALA M., SOWA M., FIDECKA S., PILC A., NOWAK G. Activation of the NMDA/glutamate receptor complex antagonizes the NMDA antagonist-

induced antidepressant-like effects in the forced swim test. *Pharmacol. Rep.*, v. 59, p. 595-600, 2007.

POLESZAK E., SZEWCZYK B., WLAZ A., FIDECKA S., WLAZ P., PILC A., NOWAK G. 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, p. 996-1000, 2008.

PORCIÚNCULA L.O., VINADÉ L., WOFCHUK S., SOUZA D.O. Guanine based purines inhibit [(3)H]glutamate and [(3)H]AMPA binding at postsynaptic densities from cerebral cortex of rats. *Brain Res.*, v. 928, p. 106-112, 2002.

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

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

PRICE D.L. New order from neurological disorders. *Nature*, v. 399, p. 3-5, 1999.

RAJKOWSKA G., MIGUEL-HIDALGO J.J. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, v. 6, p. 219-233, 2007.

RALEVIC V., BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.*, v. 50, p. 413-492, 1998.

RATHBONE M.P., CHRISTJANSON L., DEFORGE S., DELUCA B., GYSBERS J.W., HINDLEY, S., JOVETICH, S., MIDDLEMISS, P.J., TAKHAL, S. Extracellular purine nucleosides stimulate cell division and morphogenesis: pathologic and physiological implications. *Med. hypotheses*, v. 37, p. 232-240, 1992.

RATHBONE M.P., MIDDLEMISS P.J., ANDREW, C., CACIAGLI, F., CICCARELLI R., DI IORIO P., HUANG R. The trophic effects of purines and purinergic signaling in pathogenic reactions of astrocytes. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, v. 12, p. 36-45, 1998.

RATHBONE M.P., MIDDLEMISS P.J., GYSBERS J.W., ANDREW C., HERMAN M.A.R., REED J.K., CICCARELLI R., DI IORIO P., CACIAGLI F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog. Neurobiol.*, v. 59, p. 663-690, 1999.

RATHBONE M.P., SALEH T.M., CONNELL B.J., CHANG R., SU C., WORLEY B., KIM M., JIANG S. Systemic administration of guanosine promotes functional and histological improvement following an ischemic stroke in rats. *Brain Res.*, v. 1407, p. 79-89, 2011.

REDROBE, J.P., PINOT, P., BOURIN, M. The effect of the potassium channel activator, cromakalim, on antidepressant drugs in the forced swimming test in mice. *Fundam. Clin.Pharmacol.*, v. 10, 524-528, 1996.

RODRIGUES A.L.S, SILVA G. L., MATTEUSSI A.S., FERNANDES E., MIGUEL O., YUNES R.A., SANTOS A.R., CALIXTO J.B. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sciences*, v. 70, p. 1347-1358, 2002.

ROESLER R., VIANNA M.R., LARA D.R., IZQUIERDO I., SCHMIDT A.P., SOUZA D.O. Guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats. *Neuroreport*, v. 11, p. 2537-2540, 2000.

ROGÓZ Z., SKUZA G., MAJ J., DANYSZ W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology*, v. 42, p. 1024-1030, 2002.

ROMERO T.R., GALDINO G.S., SILVA G.C., RESENDE L.C., PEREZ A.C., CÔRTEZ S.F., DUARTE I.D. Ketamine activates the L-arginine/Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway to induce peripheral antinociception in rats. *Anesth Analg.*, v. 113, p. 1254-1259, 2011.

ROSA A.O., LIN J., CALIXTO J.B., SANTOS A.R., RODRIGUES A.L. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide

pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav. Brain Res.*, v. 144, p. 87-93, 2003.

SAMUELS B.A., HEN R. Neurogenesis and affective disorders. *Eur. J. Neurosci.*, v. 33, p. 1152-1159, 2011.

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

SANACORA G., GUEORGUIEVA R., EPPERSON C.N., WU Y.T., APPEL M., ROTHMAN D.L., KRYSTAL J.H., MASON G.F. Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression. *Arch. Gen. Psychiatry*, v. 61, p. 705-713, 2004.

SANACORA G., ZARATE C.A., KRYSTAL J.H., MANJI H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 7, p. 426-437, 2008.

SANTOS T.G., SOUZA D.O., TASCA C.I. GTP uptake into rat brain synaptic vesicles. *Brain Res.*, v. 1070, p. 71-76, 2006.

SARANDOL, A., SARANDOL, E., EKER, S.S., ERDINC, S., VATANSEVER, E., KIRLI, S. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. *Hum. Psychopharmacol.*, v. 22, p. 67-73, 2007.

SASABE J., CHIBA T., YAMADA M., OKAMOTO K., NISHIMOTO I., MATSUOKA M., AISO S. D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.*, v. 26, p. 4149-4159, 2007.

SAUTE J.A., DA SILVEIRA L.E., SOARES F.A., MARTINI L.H., SOUZA D.O., GANZELLA M. Amnesic effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Neurobiol. Learn. Mem.*, v. 85, p. 206-212, 2006.

SCHMIDT A.P., AVILA T.T., SOUZA D.O. Intracerebroventricular guanine-based purines protect against seizures induced by quinolinic acid in mice. *Neurochem. Res.*, v. 30, p. 69-73, 2005.

SCHMIDT A.P., BÖHMER A.E., SCHALLENBERGER C., ANTUNES C., TAVARES R.G., WOFCHUK S.T., ELISABETSKY E., SOUZA D.O. Mechanisms involved in the antinociception induced by systemic administration of guanosine in mice. *Br. J. Pharmacol.*, v. 159, p. 1247-1263, 2010.

SCHMIDT A.P., LARA D.R., SOUZA D.O. Proposal of a guanine-based purinergic system in the mammalian nervous system. *Pharmacol. Ther.*, v. 116, p. 401-416, 2007.

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

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

SEGOVIA G., PORRAS A., DEL ARCO A., MORA F. Glutamatergic neurotransmission in aging: A critical perspective. *Mech. Ageing Dev.*, v. 122, p. 1-29, 2001.

SHAHANI N., SAWA A. Protein S-nitrosylation: Role for nitric oxide signaling in neuronal death. *Biochim. Biophys. Acta.*, In press, doi:10.1016/j.bbagen.2011.07.010, 2011.

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

SHELINE Y.I., WANG P.W., GADO M.H., CSERNANSKY J.G., VANNIER M.W. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 3908-3913, 1996.

SHI C.G., WANG L.M., WU Y., WANG P., GAN Z.J., LIN K., JIANG L.X., XU Z.Q., FAN M. Intranasal administration of nerve growth

factor produces antidepressant-like effects in animals. *Neurochem. Res.*, v. 35, p. 1302-1314, 2010.

SHU L., LI T., HAN S., JI F., PAN C., ZHANG B., LI J. Inhibition of Neuron-Specific CREB Dephosphorylation is Involved in Propofol and Ketamine-Induced Neuroprotection Against Cerebral Ischemic Injuries of Mice. *Neurochem. Res.*, v. 37, p. 49-58, 2012.

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

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

SNYDER S.H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science*, v. 257, p. 494-496, 1992.

SOARES F.A., SCHMIDT A.P., FARINA M., FRIZZO M.E., TAVARES R.G., PORTELA L.V., LARA D.R., SOUZA D.O. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res.*, v. 1005, p. 182-186, 2004.

STEINERT J.R., CHERNOVA T., FORSYTHE I.D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist.*, v. 16, p. 435-452, 2010.

STERU L., CHERMAT R., THIERRY B., SIMON P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, p. 367-370, 1985.

STONE, T.W. Receptors for Adenosine and adenine nucleotides. *General. Pharmacol.*, v. 22, p. 25-31, 1991.

STRIJBOS P.J., LEACH M.J., GARTHWAITE J. Vicious cycle involving Na⁺ channels, glutamate release, and NMDA receptor mediates delayed neurodegeneration through nitric oxide formation. *J. Neurosci.*, v. 16, p. 5004-5013, 1996.

SU C., ELFEKI N., BALLERINI P., D'ALIMONTE I., BAU C., CICCARELLI R., CACIAGLI F., GABRIELE J., JIANG S. Guanosine

improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. *J. Neurosci. Res.*, v. 87, p. 617-625, 2009.

SUTTON G., CHANDLER L.J. Activity-dependent NMDA receptor-mediated activation of protein kinase B/Akt in cortical neuronal cultures. *J. Neurochem.*, v. 82, p. 1097-1105, 2002.

SUZUKI E., YAGI G., NAKAKI T., KANBA S., ASAI M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *J. Affect. Disord.*, v. 63, p. 221-224, 2001.

TANIGUCHI J., FURUKAWA K.I., SHIGEKAWA M. Maxi K⁺ channels are stimulated by cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase in canine coronary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.*, v. 423, p. 167-172, 1993.

TAROZZI A., MERLICCO A., MORRONI F., BOLONDI C., DI IORIO P., CICCARELLI R., ROMANO S., GIULIANI P., HRELIA P. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, v. 24, p. 297-306, 2010.

TASCA C.I., BURGOS J.S., BARAT A., SOUZA D.O., RAMÍREZ, G. Chick kainate binding protein lacks GTPase activity. *Neuroreport*, v. 10, p. 1981-1983, 1999.

THIERRY B., STÉRU L., SIMON P., PORSOLT R.D. The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology*, v. 90, p. 284-285, 1986.

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

TRAVERSA U., BOMBU G., DI IORIO P., CICCARELLI R., WERSTIUK E.S., RATHBONE M.P. Specific [³H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *Br. J. Pharmacol.*, v. 135, p. 969-976, 2002.

TSUBOI, H., TATSUMI, A., YAMAMOTO, K., KOBAYASHI, F., SHIMOI, K., KINAE, N. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. *J. Affect. Disord.*, v. 91, p. 63-70, 2006.

TYTGAT J., MAERTENS C., DAENENS P. Effect of fluoxetine on a neuronal, voltage-dependent potassium channel (Kv1.1). *Br. J. Pharmacol.*, v. 122, p. 1417-1424, 1997.

UEMURA Y., MILLER J.M., MATSON W.R., BEAL M.F. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke*, v. 22, p. 1548-1553, 1991.

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

VIDEBECH P., RAVNKILDE B. Hippocampal volume and depression: A meta-analysis of MRI studies. *Am. J. Psychiatry*, v. 161, p. 1957-1966, 2004.

VILPOUX C., DARPENTIER C., LEEROUX-NICOLLET I., NAUDON L., COSTENTIN J. Differential effects of chronic antidepressant treatments on μ and δ -opioid receptors in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 443, p. 85-93, 2002.

VINADÉ E.R., IZQUIERDO I., LARA D.R., SCHMIDT A.P., SOUZA D.O. Oral administration of guanosine impairs inhibitory avoidance performance in rats and mice. *Neurobiol. Learn. Mem.*, v. 81, p. 137-143, 2004.

VINADÉ E.R., SCHMIDT A.P., FRIZZO M.E.S., IZQUIERDO I., ELISABETSKY E., SOUZA D.O. Chronically administered guanosine is anticonvulsant, amnesic and anxiolytic in mice. *Brain Res.*, v. 977, p. 97-102, 2003.

VINADÉ E.R., SCHMIDT A.P., FRIZZO M.E., PORTELA L.V., SOARES F.A., SCHWALM F.D., ELISABETSKY E., IZQUIERDO I., SOUZA D.O. Effects of chronic administered guanosine on behavioral

parameters and brain glutamate uptake in rats. *J. Neurosci. Res.*, v. 79, p. 248-253, 2005.

VISWANATHA, G.L., SHYLAJA H., RAO K.S., ASHWINI Y., KUMAR V.R., MOHAN C.G., SUNIL V.G., KUMAR M.V., RAJESH S. Amelioration of immobilization stress-induced biochemical and behavioral alterations and mitochondrial dysfunction by naringin in mice: possible mechanism of nitric oxide modulation. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, v. 9, p. 1254-1263, 2011.

VOLKE V., WEGENER G., BOURIN M., VASAR E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. *Behav. Brain Res.*, v. 140, p. 141-147, 2003.

VOLPINI R., MARUCCI G., BUCCIONI M., DAL BEN D., LAMBERTUCCI C., LAMMI C., MISHRA R.C., THOMAS A., CRISTALLI G. Evidence for the existence of a specific G protein-coupled receptor activated by guanosine. *ChemMedChem*, v. 6, p. 1074-1080, 2011.

WEDZONY K., MACKOWIAK M., CZYRAK A., FIJAL K., MICHALSKA B. Single doses of MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA receptors, increase the number of 5-HT_{1A} serotonin receptors in the rat brain. *Brain Res.*, v. 756, p. 84-91, 1997.

WEGENER G., VOLKE V., HARVEY B.H., ROSENBERG R. Local, but not systemic administration of serotonergic antidepressants decreases nitric oxide synthase activity. *Brain Res*, v. 959, p. 128-134, 2003.

WILHELM E.A., JESSE C.R., BORTOLATTO C.F., BARBOSA N.B., NOGUEIRA C.W. Evidence of the involvement of K⁺ channels and PPAR γ receptors in the antidepressant-like activity of diphenyl diselenide in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 62, p. 1121-1127, 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, p. 2491-2498, 2004.

WONG M., LICINIO J. Research and treatment approaches to depression. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 2, p. 343-351, 2001.

WU S., BASILE A.S., BARGER S.W. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by secreted amyloid precursor protein (sAPP). *Curr. Alzheimer Res.*, v. 4, p. 243-251, 2007.

YANG P.C., YANG C.H., HUANG C.C., HSU K.S. (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. *J. Biol.Chem.*, v. 283, p. 2631-2643, 2008.

YILDIZ F., ERDEN B.F., ULAK G., UTKAN T., GACAR N. Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 149, p. 41-44, 2000.

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

ZARATE C. Jr., MACHADO-VIEIRA R., HENTER I., IBRAHIM L., DIAZGRANADOS N., SALVADORE G. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? *Harv. Rev. Psychiatry*, v. 18, p. 293-303, 2010.

ZARATE C.A., QUIROZ J., PAYNE J., MANJI H.K. Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. *Psychopharmacol. Bull.*, v. 36, p. 35-83, 2002.

ZARATE C.A. Jr., SINGH J.B., CARLSON P.J., BRUTSCHE N.E., AMELI R., LUCKENBAUGH D.A., CHARNEY D.S., MANJI H.K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch. Gen. Psychiatry*, v. 63, p. 856-864, 2006.

ZIMMERMANN H. Purinergic signaling in neural development. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 22, p. 194-204, 2011.

ZOMKOWSKI A.D., ENGEL D., GABILAN N.H., RODRIGUES A.L. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic

guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, v. 20, p. 793-801, 2010.