



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**RAFAELA CARNEIRO CORDEIRO**

**ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS NA ATIVIDADE  
ANTIDEPRESSIVA DA LEPTINA NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSÃO  
INDUZIDO POR LPS EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2014**

**RAFAELA CARNEIRO CORDEIRO**

**ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS NA ATIVIDADE  
ANTIDEPRESSIVA DA LEPTINA NO COMPORTAMENTO TIPO-  
DEPRESSÃO INDUZIDO POR LPS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ferrer  
Carvalho

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- C821e Cordeiro, Rafaela Carneiro.  
Envolvimento de mecanismos dopaminérgicos na atividade antidepressiva da leptina no comportamento tipo- depressão induzido por LPS em camundongos. / Rafaela Carneiro Cordeiro. – 2014.  
72 f.: il. color., enc.; 30 cm.
- Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Mestrado em Ciências Médicas, Fortaleza, 2014.  
Área de Concentração: Biomedicina.  
Orientação: Prof. Dr. André Férrer Carvalho.
1. Depressão. 2. Leptina. 3. Dopaminérgicos. I. Título.

---

CDD 616.895

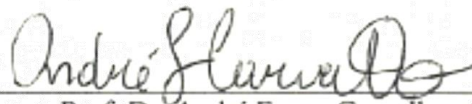
**RAFAELA CARNEIRO CORDEIRO**

**ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS NA ATIVIDADE  
ANTIDEPRESSIVA DA LEPTINA NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSÃO  
INDUZIDO POR LPS EM CAMUNDONGOS**

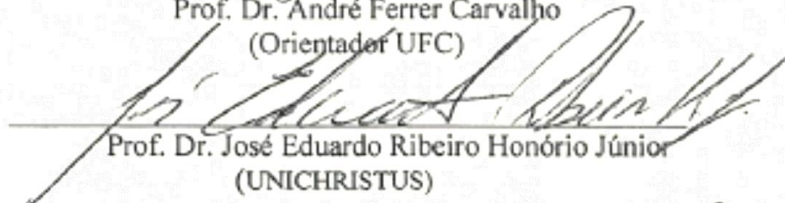
Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em: 26/09/2014.

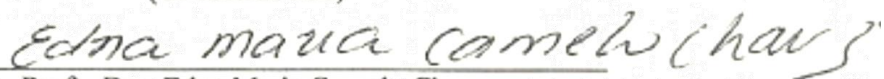
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. André Ferrer Carvalho  
(Orientador UFC)



Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior  
(UNICHRISTUS)



Prof. Dra. Edna Maria Camelo Chaves  
(UECE)

Dedico este trabalho ao meu sobrinho Isaac, que ele possa crescer cercado de conhecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe e às minhas irmãs, por estarem sempre ao meu lado para tudo o que for preciso;

À minha família, por ter sempre me dado todo o suporte que precisei para conduzir meus estudos em tranquilidade;

Ao meu namorado, Igor, pela paciência, ajuda com alguns experimentos e companhia nos congressos, me dando suporte e encorajamento sempre;

À minha co-orientadora, Danielle Macêdo, por ter me aceitado de braços abertos e sempre me encorajado a levar nossos trabalhos aonde eu pudesse ir;

Ao meu orientador André Ferrer pela oportunidade e acréscimo à minha vida profissional;

A Viviane, Camila e Isabelle, pela companhia e ajuda durante os experimentos, principalmente o encorajamento emocional, fundamentais para me fazer continuar indo durante as dificuldades;

A Francisca Lucilene Costa (Lena) e a Maria Vilani Rodrigues (Vila) por todo auxílio durante a execução dos experimentos;

A todos que compõem o Laboratório de Neurofarmacologia do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFC, por todos os momentos e experiências compartilhados, foi um prazer participar dos seus trabalhos;

A CAPES, FUNCAP e CNPQ por financiarem nossas pesquisas.

“A ciência serve para nos dar uma ideia de quão extensa é a nossa ignorância.” (Félicité Robert de Lamennais)

## RESUMO

A depressão é um transtorno crônico e recorrente, cuja prevalência na população em geral situa-se entre 3-11%, sendo altamente incapacitante e associada a aumento da morbidade por causas médicas e do risco de suicídio. A descoberta de novos antidepressivos com mecanismos de ação diversos é esperada, na perspectiva de que haja um aumento nas taxas de remissão associados ao tratamento farmacológico da depressão. A leptina foi inicialmente descrita como um hormônio anti-obesidade e posteriormente, descobriu-se a expressão das formas longas do receptor da leptina em estruturas límbicas relacionadas à regulação do humor. Estudos em humanos sugerem seu envolvimento na fisiopatologia da depressão. A ação da leptina no teste do nado forçado assemelha-se àqueles descritos para os antidepressivos, logo é possível que os receptores cognatos de dopamina (DA) envolvidos na fisiopatologia da depressão estejam envolvidos na atividade antidepressiva da leptina. Assim, o presente trabalho investigou o envolvimento da DA e seus receptores (D1- e D2-símile) em animais submetidos ao desafio imune pela administração sistêmica de LPS (0,5 mg/kg, ip). Para tanto foram avaliados os comportamentos relacionados à depressão: nado forçado, atividade locomotora e preferência por sacarose, 24 h após a administração da endotoxina, respectivamente, ponto de tempo chave para o desenvolvimento de comportamentos tipo depressivo. Também foram feitas análises neuroquímicas através da avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS), glutatona reduzida (GSH), IL-1  $\beta$  e BDNF nas áreas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Os resultados mostraram que 24 horas pós a administração de LPS ocorreu aumento da imobilidade no teste do nado forçado, redução da preferência por sacarose e nenhuma alteração no campo aberto quando comparado aos animais controle caracterizando um comportamento tipo-depressão induzido por esta endotoxina. A Leptina foi capaz de restaurar os comportamentos alterados pelo LPS aos níveis semelhantes ao controle. Nas alterações neuroquímicas ocorreu queda dos níveis de GSH em todas as áreas cerebrais estudadas de animais tratados com LPS, aumento da peroxidação lipídica e da IL-1 $\beta$ , o que está relacionado à hipótese oxidativa e inflamatória da depressão. O tratamento com leptina foi capaz de prevenir as alterações induzidas por LPS nos níveis de IL-1 $\beta$  no córtex pré-frontal e corpo estriado e aumentar os níveis de BDNF no hipocampo, semelhante à Imipramina. Estes achados mostram que neste modelo o mecanismo antidepressivo da leptina envolve um possível efeito antiinflamatório deste hormônio.

Palavras-chaves: Lipopolissacarídeo, depressão, leptina, sistema dopaminérgico.



## ABSTRACT

Depression is a chronic and recurrent disorder, whose prevalence in the general population is between 3-11%, being highly disabling and associated with increased morbidity due to medical reasons and risk of suicide. The discovery of new antidepressants with different action mechanisms is expected, with the hope that there is an increase in remission rates associated with the pharmacological treatment of depression. Leptin was first described as an anti-obesity hormone and later the expression of the long form of the leptin receptor in limbic structures related to mood regulation was discovered. Studies in humans suggest its involvement in the pathophysiology of depression. The action of leptin in the forced swimming test resembles those described for antidepressants, so it is possible that the cognate receptors of dopamine (DA) involved in the pathophysiology of depression are involved in the antidepressant activity of leptin. Thus, the present study investigated the involvement of DA and its receptors (D1 and D2-like) in animals subjected to immune challenge by systemic administration of LPS (0.5 mg / kg, ip). To do so we evaluated the behaviors related to depression: forced swimming, locomotor activity and preference for sucrose, 24 h after administration of endotoxin, respectively, key time-point for the development of depressive-like behaviors. Neurochemical analyzes were also done by evaluating the levels of lipid peroxidation (TBARS), reduced glutathione (GSH), IL-1  $\beta$  and BDNF in brain areas: prefrontal cortex, hippocampus and striatum. The results showed that 24 hours after the administration of LPS there was an increase of immobility in the forced swimming test, reduction of sucrose preference and no change in open field when compared to control animals, featuring a depression-like behavior induced by this endotoxin. Leptin was able to restore the behaviors altered by LPS similar to the control levels. In neurochemical changes there was a decrease of GSH levels in all brain areas studied in animals treated with LPS, increased lipid peroxidation and IL-1 $\beta$ , which is related to oxidative and inflammatory hypothesis of depression. Leptin treatment was able to prevent the LPS-induced changes in IL-1 $\beta$  levels in the prefrontal cortex and striatum and increase BDNF levels in hippocampus, similar to Imipramine. These findings show that in this model, the antidepressant mechanism of leptin involves a possible anti-inflammatory effect of this hormone.

Keywords: Lipopolysaccharide, depression, leptin, dopaminergic system.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição e estrutura do LPS .....	21
Figura 2 - Esquema do início do processo inflamatório após lesão e contato com patógenos	24
Figura 3 - Mecanismos de defesa celulares contra dano por EROs.....	25
Figura 4 - Vias dopaminérgicas e suas respectivas áreas cerebrais envolvidas .....	27
Figura 5 - Modelagem tridimensional da leptina humana.....	32
Figura 6 - Isoformas dos receptores da leptina.....	33
Figura 7 - Resumo do desenho experimental do trabalho .....	39
Figura 8 - Aparato utilizado para a realização do teste do campo aberto em camundongos ...	41
Figura 9 - Aparato utilizado para a realização do teste do nado forçado em camundongos ....	42
Figura 10 - Esquema do protocolo de adaptação para execução do teste de preferência por sacarose .....	42
Figura 11 - Número de cruzamentos no teste do campo aberto .....	45
Figura 12 - Tempo de imobilidade no testado nado forçado.....	46
Figura 13 - Porcentagem do consumo de sacarose no teste de preferência por sacarose .....	47
Figura 14 - Níveis de Glutathiona Reduzida no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado .....	48
Figura 15 - Níveis de Malonildialdeido no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado ...	49
Figura 16 - Níveis da citocina IL-1 $\beta$ no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado .....	50
Figura 17 - Níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro no hipocampo .....	51

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alterações biológicas causadas pela depressão.....	17
Quadro 2 - Modelos animais e seus critérios de validade.....	19
Quadro 3 - Esquema dos grupos de tratamento dos protocolos 1 e 2.....	40
Quadro 4 - Resumo dos Testes Comportamentais.....	57
Quadro 5 - Resumo dos Testes Neuroquímicos.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
°C	grau Celsius
5HT	serotonina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
APA	American Psychiatric Association
ATV	área tegumentar ventral
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
CE	corpo estriado
CEPA	Comitê de Ética de Pesquisa Animal
cm	centímetro
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CREB	proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc
CRF	fator liberador de corticotropina
PF	córtex pré-frontal
DA	dopamina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRD1	receptor de dopamina D1
DRD2	receptor de dopamina D2
DTNB	ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EDTA	ácido tetra acético etilenodiamina

EROs	espécies reativas de oxigênio
g	grama
GSH	glutathiona reduzida
GSK3	glicogênio sintase quinase 3
h	hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HP	hipocampo
i.p.	intraperitoneal
IDO	indoleamina 2,3-dioxigenase
IL-1 $\beta$	interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
Kg	quilograma
LBP	proteína ligante de LPS
LPS	lipopolissacarídeo
MAO	monoamina oxidase
MD-2	proteína mielóide diferenciadora 2
MDA	malonildialdeído
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar

NA	noradrenalina
NAc	núcleo accumbens
NADPH	fosfato dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NBT	nitro-blue-tetrazólio
NFKB	fator nuclear kappa B
nm	nanômetro
nM	nanomolar
NMDA	N-metil D-aspartato
PAF	fator ativador de plaquetas
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
PKC	proteína quinase C
PLC	fosfolipase C
rpm	rotação por minuto
SNC	sistema nervoso central
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TFK	tampão fosfato de sódio
TLR4	receptor toll-like 4
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Depressão Severa.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.1</b>	<i>Hipóteses e Fisiopatologia da Depressão.....</i>	<b>15</b>
<b>1.1.2</b>	<i>Modelos animais de depressão.....</i>	<b>18</b>
<b>1.1.3</b>	<i>Lipopolissacarídeo.....</i>	<b>21</b>
<b>1.1.4</b>	<i>Neuroinflamação.....</i>	<b>23</b>
<b>1.2</b>	<b>Sistema Dopaminérgico.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.1</b>	<i>Circuitos Dopaminérgicos de Recompensa e possíveis áreas afetadas na Depressão.....</i>	<b>27</b>
<b>1.2.2</b>	<i>Padrões de atividade celular e Receptores Dopaminérgicos.....</i>	<b>29</b>
<b>1.2.3</b>	<i>Recompensa x Depressão.....</i>	<b>30</b>
<b>1.3</b>	<b>Leptina e Depressão.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>PERGUNTAS DE PARTIDA.....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Drogas.....</b>	<b>39</b>
<b>5.3</b>	<b>Desenho Experimental.....</b>	<b>39</b>
<b>5.4</b>	<b>Tratamento.....</b>	<b>40</b>
<b>5.4.1</b>	<i>Protocolo 1.....</i>	<b>40</b>
<b>5.4.2</b>	<i>Protocolo 2.....</i>	<b>40</b>
<b>5.5</b>	<b>Testes Comportamentais.....</b>	<b>41</b>
<b>5.5.1</b>	<i>Teste do Campo Aberto.....</i>	<b>41</b>

5.5.2	<i>Teste do Nado Forçado</i> .....	41
5.5.3	<i>Teste de Preferência por Sacarose</i> .....	42
5.6	<b>Determinações Neuroquímicas</b> .....	43
5.6.1	<i>Dissecação das áreas cerebrais</i> .....	43
5.6.2	<i>Avaliação dos níveis de GSH</i> .....	43
5.6.3	<i>Avaliação dos níveis de TBARS</i> .....	44
5.6.4	<i>Determinação de níveis de IL-1<math>\beta</math></i> .....	44
5.6.5	<i>Determinação de níveis de BDNF</i> .....	44
5.7	<b>Análise Estatística</b> .....	44
6	<b>RESULTADOS</b> .....	45
6.1	<b>Avaliações Comportamentais</b> .....	45
6.1.1	<i>Teste do Campo Aberto</i> .....	45
6.1.2	<i>Teste do Nado Forçado</i> .....	46
6.1.3	<i>Teste de Preferência por Sacarose</i> .....	47
6.2	<b>Avaliações Bioquímicas</b> .....	48
6.2.1	<i>Níveis de GSH nas áreas cerebrais</i> .....	48
6.2.2	<i>Níveis de TBARS nas áreas cerebrais</i> .....	49
6.2.3	<i>Níveis de IL-1<math>\beta</math> nas áreas cerebrais</i> .....	50
6.2.4	<i>Níveis de BDNF nas áreas cerebrais</i> .....	51
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	52
7.1	<b>Considerações Finais</b> .....	57
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Depressão

A depressão é um transtorno crônico e recorrente, caracterizado pela presença de cinco ou mais dos seguintes sintomas: humor deprimido, anedonia, sensação de inutilidade ou culpa excessiva, dificuldade de concentração, fadiga ou perda de energia, distúrbios do sono, problemas psicomotores, perda ou ganho significativo de peso, idéias recorrentes de morte ou suicídio, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Distúrbios Mentais (DSM-IV-TR, 2000) da Associação Psiquiátrica Americana (APA). Esses sintomas aparecem com frequência e podem combinar-se entre si (QUEVEDO, 2009).

Sua prevalência na população em geral varia entre 3-11% (FLECK, 2009; MUELLER *et al.*, 1999; POSTERNAK *et al.*, 2006). Em grande parte dos estudos de realizados em comunidades no Brasil e no mundo, a prevalência de depressão durante um ano está entre 8 a 12%, havendo associação com o gênero feminino e ser solteira. Além disso, possui o pico de prevalência no final da meia-idade (VILLANO; GNANHAY, 2011). Uma metanálise de 23 estudos estimou a prevalência da depressão durante a vida em 6,7% (WARAICH *et al.*, 2004). A depressão está associada à incapacidade funcional (PENNINX *et al.*, 1999) e ao comprometimento da saúde física (EVANS *et al.*, 2005). Além do mais, a depressão está associada a maior utilização de serviços de saúde (JOHNSON *et al.*, 1992) e a maior risco de suicídio em todas as faixas etárias (HARRIS; BARRACLOUGH, 1997).

Uma informação importante obtida com a prática clínica diária é a observação de que inibidores da recaptção de monoaminas e outros moduladores da função monoaminérgica melhoram os sintomas em cerca de 50% dos pacientes deprimidos e produzem uma remissão em 30% - 40% dos pacientes (CARVALHO *et al.*, 2007; THASE *et al.*, 2001; TRIVEDI *et al.*, 2006). Estes dados ilustram a enorme heterogeneidade genética de resposta ao tratamento e esforços estão sendo feitos para identificar preditores farmacogenéticos de uma resposta favorável ao tratamento com agentes monoaminérgicos (GARRIOCK *et al.*, 2010; UHER *et al.*, 2009).

### ***1.1.1 Hipóteses e Fisiopatologia da Depressão***

No início da década de 60, surge a hipótese monoaminérgica da depressão, baseada na resposta terapêutica com drogas que aumentam os níveis de monoaminas e

melhoram os sintomas depressivos. A partir de então, postulou-se que a depressão mental é devido à deficiência da atividade monoaminérgica do cérebro (SCHILDKRAUT, 1965). Recentemente afirma-se que este transtorno mental resulta, em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica na fenda sináptica (ELHWUEGI, 2004).

Uma característica da hipótese monoaminérgica que por muito tempo foi desconsiderada é que ela propõe um mecanismo único para depressão e para drogas antidepressivas: a depressão resulta de uma diminuição dos níveis de funcionamento de noradrenalina (NA) e/ou serotonina (5HT), os quais os antidepressivos restauram. Essa mesma simetria é vista em muitas hipóteses recentes, no entanto, a suposição de simetria está incorreta. Há muitas diferenças entre as bases neurais da depressão e ação antidepressiva, e a ação dos antidepressivos não pode ser descrita como revertendo e normalizando os processos que são disfuncionais no cérebro em depressão (WILLNER *et al.*, 2013).

Uma evidência de que o cérebro de um paciente tratado com antidepressivos não está em um estado normal vem de estudos em que os efeitos antidepressivos dessas drogas são bloqueados por tratamentos agudos. Por exemplo, no trabalho de Willner *et al.* (2005), pacientes deprimidos que tinham sido tratados com sucesso com ISRSs, receberam uma dose baixa de sulpirida, bloqueador do receptor D2 de dopamina (DRD2). Isso causou um retorno do humor deprimido nos pacientes tratados, enquanto no grupo controle não tratado com antidepressivos e não deprimido gerou uma leve melhora do humor. Portanto, outras vias de sinalização e neurotransmissores podem estar relacionados com a fisiopatologia da depressão, descritos no quadro 1.

Assim, desde a década de 80, processos imunoinflamatórios vindo sendo relacionados com a etiologia da depressão (DANTZER *et al.*, 2008). É relatado que uma infecção bacteriana gera comportamento de doença (do inglês, *sickness behavior*) e poderia causar depressão através de alterações no estresse oxidativo e nitrosativo celular e nas redes de citocinas (LEONARD; MAES, 2012). Desta forma, o comportamento tipo-depressivo em animais pode ser induzido com um estímulo inflamatório periférico de forma aguda, embora os mecanismos envolvidos ainda estejam parcialmente desconhecidos (DANTZER *et al.*, 2008).

Quadro 1 - Sistemas de neurotransmissores e mecanismos de transdução de sinal envolvidos na fisiopatologia da depressão

<b>Alteração:</b>	<b>Autor:</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• via da L-arginina / óxido nítrico (NO)</li> </ul>	TOMAZ <i>et al.</i> (2014)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• sistema glutamatérgico</li> </ul>	PETRIE <i>et al.</i> (2000)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• canais de cálcio(Ca) e potássio (K+)</li> </ul>	GUO <i>et al.</i> (1996)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• sistema opióide</li> </ul>	GABILONDO <i>et al.</i> (1995)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• sistema GABAérgico</li> </ul>	NAKAGAWA <i>et al.</i> (1996)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK)/cinase regulada por sinal extracelular (ERK).</li> </ul>	DWIVEDI <i>et al.</i> (2001)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB);</li> <li>• Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).</li> </ul>	MANJI <i>et al.</i> (2000)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína cinase C (PKC);</li> <li>• Proteína cinase A (PKA);</li> <li>• Glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3).</li> </ul>	PICCHINI (2004)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteína antiapoptótica Bcl2.</li> </ul>	PERERA <i>et al.</i> (2007)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liberação de citocinas pró-inflamatórias associadas com a ativação do sistema imune.</li> </ul>	DUNN; SWIERGIEL (2005)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides;</li> <li>• Desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).</li> </ul>	PERERA <i>et al.</i> (2007) PITTENGER; DUMAN (2008)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento no estresse oxidativo.</li> </ul>	BILICI <i>et al.</i> (2001)

Fonte: adaptado de TOMAZ, 2014.

Apesar dos avanços recentes na compreensão da fisiopatologia da depressão (KRISHNAN; NESTLER, 2008), o tratamento farmacológico deste transtorno até a presente data baseia-se em fármacos que exploram a antiga hipótese monoaminérgica da depressão (RACAGNI; POPOLI, 2010; SCHILDKRAUT, 1965). A pesquisa de novos fármacos antidepressivos com mecanismos farmacodinâmicos distintos vem sendo alvo de esforços científicos crescentes (ALAMO; LOPEZ-MUNOZ, 2009; BERTON; NESTLER, 2006), na esperança de incrementar as taxas de remissão terapêutica.

### ***1.1.2 Modelos animais de depressão***

Por volta de 1865, Claude Bernard em seus estudos fisiológicos deu origem ao uso de animais como modelo de estudo, transpondo para a fisiologia humana. Em seu trabalho "Introdução ao Estudo da Medicina Experimental", tentou estabelecer as regras para o estudo experimental da medicina e enfatizava a aplicabilidade da experimentação animal aos humanos. Atualmente, modelos animais são usados em todos os campos da pesquisa biológica (FAGUNDES; TAHA, 2004).

Assim, muitos modelos animais são utilizados com o propósito de elucidar alguns aspectos da fisiopatologia da depressão, sendo indispensáveis para o estudo de novos alvos de drogas antidepressivas (CRYAN *et al.*, 2002; CRYAN; SLATTERY, 2007). O maior contratempo desses métodos é a incapacidade de medir os diferentes níveis de emocionalidade conhecidos apenas em humanos (WONG; LICINIO, 2001).

Assim, os modelos devem seguir critérios para sua validação: 1) validade de face: as manifestações comportamentais devem ser semelhantes aos sintomas observados em pacientes; 2) validade de constructo: as alterações fisiopatológicas que ocorrem em pacientes com depressão também devem ocorrer nos animais; 3) validade preditiva: as alterações comportamentais devem ser revertidas por tratamentos efetivos na clínica (ABELAIRA *et al.*, 2013).

Muitos são os modelos animais de depressão desenvolvidos com base nos critérios de validade, e ainda mais estão sendo estudados. O quadro 2 mostra alguns desses modelos e os critérios de validade de cada um.

Quadro 2 - Modelos animais e seus critérios de validade

Modelo	Critérios		
	Face	Constructo	Preditiva
Testes do nado forçado e suspensão de cauda	-	-	+
Estressores crônicos (por exemplo, desamparo aprendido, estresse crônico leve e derrota social)	+	+	+
Privação materna	+	+	+
Estimulação do sistema imune (por exemplo, endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias)	+	+	+

Fonte: adaptado de QUEVEDO; SILVA, 2013.

O teste do nado forçado, também conhecido como o teste de Porsolt, é o modelo animal mais amplamente utilizado na pesquisa da depressão, mais especificamente como um filtro para tratamentos antidepressivo (LUCKI, 1997; PORSOLT, 2000). O teste envolve colocar um roedor em um tanque cheio com água e deve ser medido o período em que o animal fica imóvel ou o tempo de latência para tornar-se imóvel. Uma possível interpretação dele é que os antidepressivos podem aumentar respostas ativas de enfrentamento para o estresse da natação.

Uma variante do teste do nado forçado, utilizado em camundongos, é o teste de suspensão de cauda (STERU *et al.*, 1985). A principal vantagem destes dois testes é o seu rendimento relativamente elevado e facilidade de utilização, além disso, podem ser utilizados para avaliar comportamentos do tipo depressivos em outros modelos animais. Entretanto, ambos têm apenas validade preditiva.

Quanto aos testes que envolvem resposta de um animal ao estresse, um deles é o desamparo aprendido. Nele, alguns animais que estão expostos ao choque inescapável, posteriormente, deixam de escapar de uma situação em que a fuga é possível (HITZEMANN, 2000; WILLNER, 1984). A interpretação é que qualquer diferença encontrada entre os grupos pode ser atribuída à variável psicológica de controle sobre a rescisão de choque. Animais com desamparo aprendido mostram várias alterações neurovegetativas que são reminiscentes de depressão, como alterações dos movimentos oculares rápidos do sono, redução do peso corporal, comportamento sexual diminuído, e níveis de CRF (fator liberador de corticotropina) e corticosterona elevados.

Vários testes, relacionados com o desamparo aprendido e com base na exposição de animais ao estresse incontrolável têm sido utilizados em ratos. No paradigma do estresse crônico leve, roedores são expostos a uma variedade de tensões relativamente suaves (isolamento de habitação, perturbações de ciclos claro-escuro, alimento breve ou privação de água, inclinação das gaiolas) intermitentemente por períodos relativamente longos de tempo (por exemplo, várias semanas) (WILLNER, 1997).

Outro modelo baseado em estresse é a derrota social. Aqui, um animal é exposto repetidamente a um animal agressivo e dominante, em alguns laboratórios nenhum contato físico é envolvido, em outros os animais derrotados experimentam coação física leve (BLANCHARD *et al.*, 2001).

A vantagem desses testes com estressores crônicos é que eles cumprem os três critérios de validade para modelos animais. Há relatos de apresentação de comportamento anedônico, inferido a partir de uma redução no consumo de sacarose, bem como uma variedade de sequelas cardiovasculares ou neuroendócrinas, que são revertidas por tratamento antidepressivo em longo prazo em alguns estudos (WANG, J. *et al.*, 2013; WILLNER *et al.*, 1992). A principal desvantagem deles é a sua baixa reprodutibilidade.

Modelos que envolvem a manipulação de ambiente de vida precoce têm sido utilizados, incluindo o estresse pré-natal, manuseamento pós-natal precoce, e privação materna. O enriquecimento ambiental tem sido utilizado como um estímulo recíproco. Os modelos de estresse precoce produzem alterações neuroendócrinas e comportamentais em ratos e camundongos que persistem na vida adulta. Estudos voltados à compreensão dos mecanismos neurobiológicos das várias anormalidades só agora estão começando a ser utilizados (CALDJI *et al.*, 2000; FRANCIS *et al.*, 1996; LADD *et al.*, 2000; MEANEY, 2001).

Diversos estudos recentes dão atenção especial ao papel do sistema imune na depressão, já que mediadores inflamatórios interagem com vias relacionadas a esse transtorno, como metabolismo de neurotransmissores, funções neuroendócrinas e plasticidade neural. As críticas em relação a esses modelos que envolvem o sistema imune são relacionadas ao fato de ainda não se entender completamente a complexidade entre a comunicação do cérebro e esse sistema (QUEVEDO; SILVA, 2013).

Apesar disso, o modelo de comportamento depressivo induzido pela administração sistêmica de um lipopolissacarídeo de bactéria gram-negativa, LPS, vem sendo cada vez mais utilizado para seleção de novos fármacos antidepressivos, pois é de fácil uso e

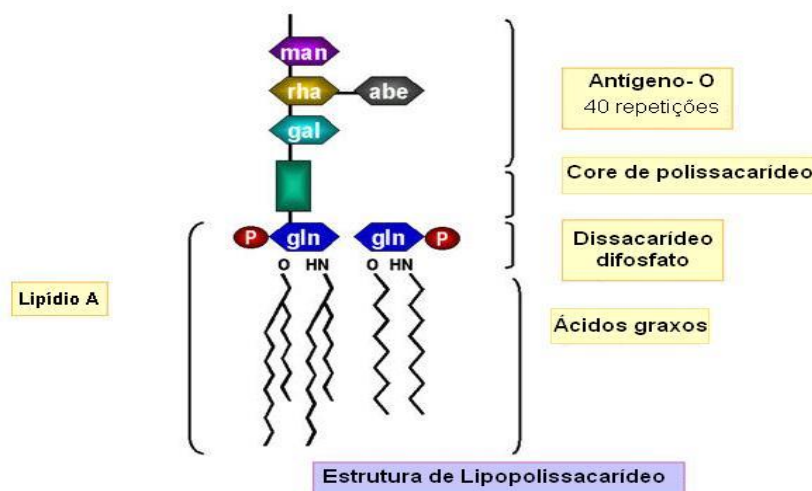
de boa reprodutibilidade (CRYAN *et al.*, 2002; CRYAN; SLATTERY, 2007; CUSTODIO *et al.*, 2013; LEONARD; MAES, 2012; NESTLER *et al.*, 2002a; NESTLER *et al.*, 2002b).

### 1.1.3 Lipopolissacarídeo

Assim, para gerar um modelo de comportamento depressivo, o LPS é administrado de forma sistêmica no animal. A endotoxina, como também é conhecida, é uma molécula derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. O LPS é liberado da membrana quando a bactéria se multiplica ou é fagocitada e degradada pelas células do sistema imune. Uma molécula altamente tóxica, o LPS é considerado atualmente o fator responsável pelas manifestações de infecções por bactérias gram-negativas e por inflamação sistêmica (SCHWARZ; BILBO, 2011).

Sua estrutura é composta por: (1) lipídeo A, o glicolipídeo, considerado o responsável pela atividade antigênica do LPS, posicionado na região mais interna da molécula em relação à membrana e formando uma região hidrofóbica; (2) *core*, uma camada de polissacarídeo, que fica no centro da molécula, e (3) antígeno O, composto por cadeias repetidas de oligossacarídeos, posicionado na região externa, que juntos formam a parte hidrofílica da molécula (Figura 1) (BILBO; SCHWARZ, 2012; RAETZ; WHITFIELD, 2002).

Figura 1 - Composição e estrutura do LPS



Fonte: [http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/chapter\\_4\\_bp.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/chapter_4_bp.htm)

O LPS desencadeia vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores próprios que resultam nas reações inflamatórias. É um antígeno fraco e não específico, mas que não é muito facilmente neutralizado pelos anticorpos, ativando assim a cascata do complemento. Essa ativação envolve a formação de cininas, importantes mediadores da inflamação, além da ativação de plaquetas, de mastócitos, de basófilos e de células endoteliais (SHIMADA *et al.*, 2012). Os macrófagos são assim induzidos a secretarem citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e IL-8, fator de necrose tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico, interferons, fator ativador de plaquetas (PAF) e prostaglandinas (CHRISTIANSEN *et al.*, 2012).

Os receptores que reconhecem o LPS são denominados receptores Toll-like 4 (TLR4). O reconhecimento do LPS também é mediado por outras moléculas como a proteína CD14 que pode estar sobre a forma solúvel (sCD14) na circulação ou ancorada à membrana celular (mCD14), a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) podendo também ser encontrada nas formas solúvel ou ancorada, e ainda a proteína ligante de LPS (LBP, do inglês, *Lipopolysaccharide Binding Protein*). Essas proteínas na versão solúvel atuam como auxiliares, sendo responsáveis por transportar o LPS para o receptor TLR4, ou para o complexo entre o receptor TLR4 e a proteína MD-2, sendo este complexo considerado a forma principal de reconhecimento do LPS (AKIRA; TAKEDA, 2004; SHIMAZU *et al.*, 1999).

A ativação dos receptores TLR4 pode desencadear diversas vias de sinalização, sendo uma das principais a via do fator de transcrição NF $\kappa$ B (do inglês, *Nuclear Factor kappa B*) que após a sua translocação do núcleo, promove a transcrição de diversos genes assim aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

O LPS administrado por via sistêmica ou intracerebral desencadeia a ativação da microglia e subsequentemente o aumento da expressão de citocinas. Assim, desde a década de 90, a administração sistêmica do LPS vem sendo utilizado como modelo para induzir neuroinflamação (BAN *et al.*, 1992; LAYE *et al.*, 1994).

Nos estudos recentes de neuroinflamação, as alterações de comportamento causadas pelo LPS são relacionadas ao tempo decorrido após administração sistêmica do LPS. Assim, as alterações comportamentais durante o pico de liberação de citocinas, ou de curto prazo, foram qualificadas como comportamento de doença, enquanto as alterações após o pico de citocinas, ou de longo prazo, foram qualificadas como comportamento do tipo depressivo (DANTZER *et al.*, 2008; LEONARD; MAES, 2012).



Em trabalhos no nosso grupo de pesquisa, foram identificados sintomas tipo-depressivos em camundongos, além de alterações de níveis de peroxidação lipídica, GSH e nitrito em todas as áreas do cérebro, quando medidos 24 horas após o tratamento com LPS (CUSTODIO *et al.*, 2013). Além disso, também foi demonstrado que a doxiciclina, tetraciclina sintética de longa ação, é comparável a imipramina, um tricíclico utilizado na prática clínica, em efetivamente melhorar o comportamento tipo depressivo induzido por LPS (MELLO *et al.*, 2013). Também foi investigada e verificada uma possível ação neuroprotetora do NO no mesmo modelo (TOMAZ *et al.*, 2014).

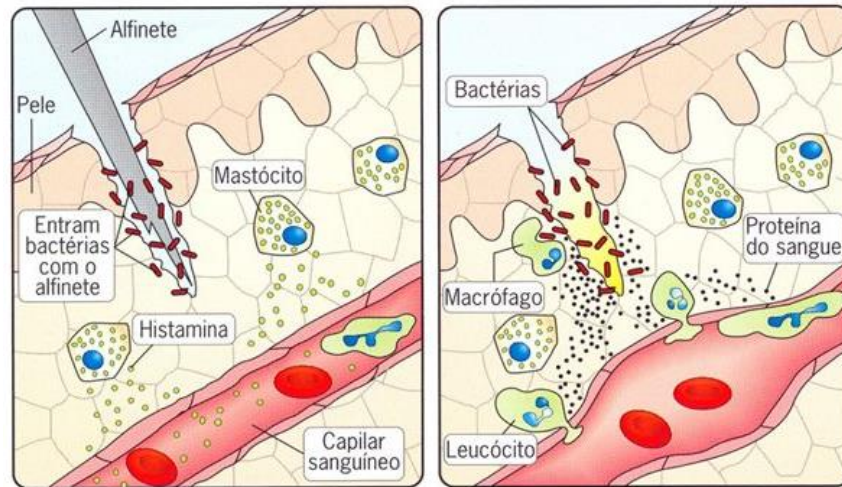
#### **1.1.4 Neuroinflamação**

Sabe-se que existe uma extensa comunicação entre o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC). Atualmente, o termo neuroinflamação tem sido utilizado para descrever a investigação dessa comunicação e assim determinar o papel dos processos inflamatórios na fisiopatologia das diversas doenças do SNC, tais como depressão, Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, transtorno afetivo bipolar, autismo (MAES *et al.*, 2011a).

A inflamação do SNC é caracterizada por alterações patológicas tais como aumento de ativação glial, aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e migração de leucócitos. Entre os principais fatores que conduzem este processo estão a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), quimiocinas e radicais livres de oxigênio, todos sendo indutores das vias de sinalização em cascata que contribui para a etiologia e o agravamento de diversas desordens neurodegenerativas (CHEN *et al.*, 2008; GODBOUT *et al.*, 2005).

O processo inflamatório envolve inicialmente a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios, e em nível periférico células geradas a partir da cascata do complemento, neutrófilos e macrófagos, gerando radicais livres (espécies reativas de oxigênio) nos locais de infecção (figura 2). No SNC os responsáveis por esse papel são a ativação da microglia e astrogliá, muitas vezes referidas como gliose, nos locais de lesão. Ambas são consideradas células tanto sintetizadoras como alvo de mediadores pró-inflamatórios e de geradores de radicais livres (CZAPSKI *et al.*, 2010).

Figura 2 - Esquema do início do processo inflamatório após lesão e contato com patógenos



Agentes patogênicos provocam a liberação de substâncias químicas por parte de células, como os mastócitos. Essas mesmas substâncias liberadas geram uma dilatação dos vasos sanguíneos, permitindo a passagem de sangue e plasma, bem como neutrófilos, monócitos e leucócitos atraídos por quimiotaxia. Os monócitos convertem-se em macrófagos, que liberam fatores pró-inflamatórios. Fonte: <http://migre.me/IKHI8>

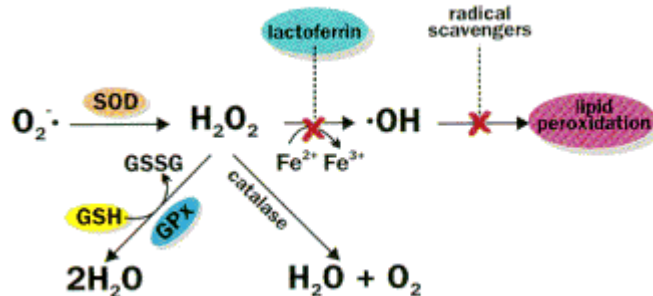
Os efeitos danosos da ativação glial podem ser gerados por respostas anormais ou prolongadas ao insulto neural primário, ou a desordem ou lesão do SNC pode diretamente gerar sua ativação. Em contrapartida, a microglia e os astrócitos são fontes de fatores tróficos possivelmente importantes na plasticidade, desenvolvimento e reparação do SNC, e estão envolvidas em processos fisiológicos como estresse, dor e respostas autonômica e imune (CZAPSKI *et al.*, 2010).

Assim, a inflamação sistêmica pode gerar processos relacionados à patogênese de algumas doenças neurodegenerativas. Um desses processos é o estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), geradas por processos inflamatórios e consideradas oxidantes, e os agentes antioxidantes, resultando em um estado pró-oxidante prejudicial às funções vitais (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

A produção de EROs, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $-OH$ ), é consequência natural da respiração aeróbica. Entretanto estas espécies podem causar danos estruturais aos componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios. O organismo possui mecanismos antioxidantes celulares enzimáticos e não enzimáticos, que controlam e regulam a ação de radicais livres e de EROs, protegendo assim o organismo da oxidação de biomoléculas. Este sistema antioxidante compreende as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona

peroxidase (GPx), além de agentes oxidantes como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, bilirrubina (HUBER *et al.*, 2008) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismos de defesa celulares contra dano por EROs



A enzima SOD, junto com catalase ou GPx eliminam várias espécies de oxigênio danosas. Ligantes de metais (Lactoferrin) e antioxidantes sequestradores de radicais (p.e., Vitamina E) limitam mais ainda o dano. Fonte: <http://www.rndsystems.com/resources/images/5270.gif>

O estresse oxidativo é o subproduto da fosforilação oxidativa, participando de vários processos celulares homeostáticos, como: apoptose, mitose e resposta a lesões ou infecções. Entretanto, em muitos processos celulares, o nível de produção de EROs pode aumentar a ponto de superar os mecanismos antioxidantes celulares, caracterizando, assim, o estresse oxidativo. Uma vez que apresenta um alto consumo de oxigênio e conteúdo lipídico, substrato para a peroxidação lipídica, o SNC é bastante afetado por esse tipo estresse (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010).

A vitamina E, as enzimas SOD, catalase e GPx e seu substrato glutatona (GSH) tendem a ter uma concentração mais elevada em locais onde danos por EROs são mais prováveis (por exemplo, em locais mais altamente oxigenados) e potencialmente mais prejudiciais. Além disso, como EROs têm meia-vida extremamente curta, eles são difíceis de medir diretamente. (MOSLEN, 1994). Assim, o que pode ser medido são os vários produtos do dano produzido pelo estresse oxidativo, tais como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*).

De várias formas o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese da depressão: i) Quando os antioxidantes e enzimas antioxidantes estão diminuídos, há uma maior resposta inflamatória, o que pode gerar aumento nos níveis de citocinas, mediando mais sintomas de inflamação; ii) Algumas das citocinas pró-inflamatórias podem aumentar a atividade da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), elevando assim o metabolismo do triptofano pela via da quinurenina, que gera compostos como o ácido quinolínico, estimulante da neurotransmissão glutamatérgica (MAES *et al.*, 2011a).

Desta maneira, os transtornos psiquiátricos podem estar relacionados a um excesso de EROs, já que estas moléculas são fatores de prejuízos importantes em inúmeros processos lesivos. Em corroboração, foi detectada uma correlação do aumento de estresse oxidativo com sintomas depressivos em pacientes, comprovado pelo aumento da peroxidação lipídica e pela redução das defesas antioxidantes no plasma de pacientes (TSUBOI *et al.*, 2006).

Existem várias linhas de evidência em humanos que certas citocinas e outros sistemas regulados pelo estresse podem induzir síndromes do tipo depressivo em indivíduos sem história de transtornos de humor. Por exemplo, a depressão é relatada como um efeito colateral frequentemente limitante em pacientes com hepatite C ou a esclerose múltipla tratados com interferon- $\alpha$  ou várias interleucinas (FONTANA *et al.*, 2000; MAIER *et al.*, 1999). Do mesmo modo, a depressão tem sido relatada como um efeito colateral grave em pacientes que utilizam derivados de ácido retinóico para o tratamento de acne grave (BERNSTEIN; LEVENTHAL-ROCHON, 1996).

## 1.2 Sistema Dopaminérgico

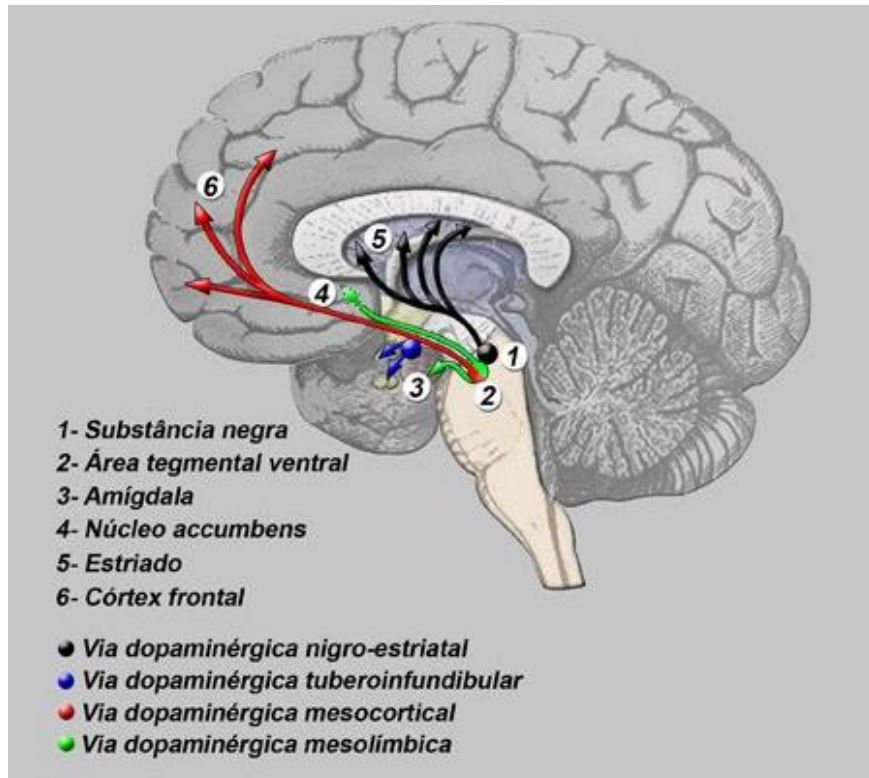
A busca de uma possível base neuroanatômica da depressão induzida por citocinas tem recaído sobre os circuitos cerebrais que estão envolvidos no processamento de emoções e retardo psicomotor, já que ambos estão alterados em pacientes com depressão clínica. Embora as observações feitas em estudos animais sejam indiretas e qualitativas em relação ao comportamento tipo depressivo induzido por LPS, elas apontam para um possível papel do hipocampo, amígdala expandida e hipotálamo na fisiopatologia da depressão (DANTZER *et al.*, 2008).

As monoaminas mais estudadas na depressão são a noradrenalina e serotonina, mas atualmente a dopamina vem recebendo mais ênfase neste estudo. O sistema dopaminérgico é distribuído para regiões do cérebro restritas, conhecidas como projeções dopaminérgicas mesocortical, mesolímbica e nigroestriatal. O sistema dopaminérgico mesocortical fornece projeções para o córtex pré-frontal medial e cingulado, ao passo que o sistema dopaminérgico mesolímbico inerva o núcleo accumbens (NAc), bem como a amígdala e o septo (figura 4) (NESTLER; CARLEZON, 2006).

O sistema dopaminérgico tem sido implicado na depressão, e a dopamina no NAc tem sido de interesse particular, já que esta é associada a recompensa, motivação e prazer (KOOB; BLOOM, 1988). Complementarmente, anormalidades dopaminérgicas nas áreas

límbicas do cérebro foram observadas em diversos modelos animais de depressão (DREMENCOV *et al.*, 2005; KRAM *et al.*, 2002; ZANGEN *et al.*, 2001). Perturbações da função deste sistema na via mesolímbica causam anedonia, um sintoma cardinal da depressão em humanos, bem como em roedores (WILLNER *et al.*, 1992).

Figura 4 - Vias dopaminérgicas e suas respectivas áreas cerebrais envolvidas



Fonte: <http://oneurotransmissor.blogspot.com.br/2013/05/patologias-causas-esquizofrenia.html>

### 1.2.1 Circuitos Dopaminérgicos de Recompensa e possíveis áreas afetadas na Depressão

As vias de recompensa são responsáveis por direcionar os sentimentos de motivação, recompensa e comportamento (VOLKOW *et al.*, 2011a). As propriedades de reforço da auto-estimulação intracraniana direta em roedores levaram à apreciação de uma série de regiões subcorticais críticas para os comportamentos de recompensa e apetitivo. As duas principais estruturas envolvidas nos efeitos da auto-estimulação intracraniana são o hipotálamo lateral e o feixe prosencefálico medial, este último contendo projeções dopaminérgicas ascendentes da área tegmentar ventral (ATV) para o NAc (NESTLER; CARLEZON, 2006).

O NAc está envolvido na motivação, recompensa, função motora e de aprendizagem. Seus neurônios estão anatomicamente situados para integrar sinais dopaminérgicos relacionados à recompensa a impulsos de entrada glutamatérgicos no córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala (SCHLAEPFER *et al.*, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que o NAc pode desempenhar um papel importante na etiologia e fisiopatologia da depressão.

Um estudo recente indicou que uma das regiões do NAc, o *core* está envolvido no controle do comportamento dirigido a fins por processos associativos, enquanto o *shell* do NAc controla o aumento dos efeitos de drogas (ITO *et al.*, 2004). Impulsividade aumentada é freqüentemente observada na depressão, portanto, é concebível que o NAc esteja envolvido na habilidade de resolver problemas, já que se assume que o aumento da impulsividade deve ter algum efeito sobre tomadas de decisão ou tentativas de suicídio (SHIRAYAMA; CHAKI, 2006). Outro estudo demonstrou que a habituação das respostas dopaminérgicas a estímulos aversivos não foi observado no *core* do NAc, mas foi observado no *shell*, indicando que o seu núcleo manipula valores motivacionais genéricos enquanto o *shell* integra valência motivacional e novidade (BASSAREO; DI CHIARA, 1999).

Além disso, foi relatado que o estresse crônico reduz o aumento dos impulsos de saída de dopamina no *shell* do NAc induzido por cocaína (GAMBARANA *et al.*, 1999), indicando uma diminuição da capacidade de resposta a ambos os estímulos aversivos e prazerosos. Estes estudos dão apoio a relação proposta entre comportamento depressivo e atividade dopaminérgica no NAc (SHIRAYAMA; CHAKI, 2006). Esta hipótese é fortalecida por estudos que descrevem como agentes dopaminérgicos, tais como inibidores da recaptação da dopamina, presumivelmente por aumento da concentração de dopamina sináptica disponível, foram bem sucedidos no tratamento de depressão severa (GARATTINI, 1997; ZUNG, 1983).

A droga psicotomimética fenciclidina, um antagonista não competitivo do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA), elevou níveis extracelulares de dopamina no *shell* do NAc mas não no *core* (MARCUS *et al.*, 2001). Fenciclidina, quando injetado diretamente no *shell*, mas não no *core*, resulta em atividade de recompensa (CARLEZON *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que impulsos de entrada dopaminérgicos (e glutamatérgicos) para a região *shell* do NAc podem estar mais envolvidos no efeito de recompensa do que impulsos semelhantes ao núcleo do NAc (SHIRAYAMA; CHAKI, 2006).

Neurônios do NAc mostram inúmeras mudanças induzidas por estresse e antidepressivos (NESTLER; CARLEZON, 2006). Um exemplo é a modulação da proteína

ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB, do inglês *cAMP response element-binding protein*): enquanto o estresse do isolamento social prolongado reduz a atividade de CREB e gera um fenótipo predominantemente ansioso (WALLACE *et al.*, 2009), estressores ativos ou drogas de abuso aumentam a atividade de CREB e promovem anedonia, na presença de uma série de recompensas naturais e narcóticas (NESTLER; CARLEZON, 2006). Estudos de neuroimagem com humanos deprimidos mostram que índices quantitativos de anedonia são associados com baixo volume do NAc (WACKER *et al.*, 2009), bem como hipoativação desta área cerebral durante tarefas simples de recompensa de incentivo (PIZZAGALLI *et al.*, 2009; SMOSKI *et al.*, 2009).

Um estudo recente realizado em ratos tratados com LPS indicou que as alterações eletrofisiológicas, metabólicas e morfológicas foram relacionadas com uma diminuição no número de células neuronais no hipocampo e córtex (SEMMLER *et al.*, 2008). Estudos com microscopia eletrônica também revelaram muitas alterações patológicas no hipocampo 48 h após administração sistêmica de LPS, tais características morfológicas são evidência de morte celular por apoptose após tratamento com LPS (CZAPSKI *et al.*, 2010).

### ***1.2.2 Padrões de atividade celular e Receptores Dopaminérgicos***

Em condições basais, neurônios dopaminérgicos na ATV oscilam entre padrões de atividade tônica (baixa frequência de potenciais de ação regular) e padrões de atividade fásica (rajadas de potenciais de ação) (SCHULTZ, 2002). Recompensas inesperadas produzem um aumento transitório no disparo fásico (codificando de um "erro de previsão de recompensa"), que é suficiente para reforçar comportamentos antecedentes (TSAI *et al.*, 2009). Drogas de abuso agem sobre os circuitos de recompensa e auxiliares através de diferentes mecanismos, no entanto, todos eles levam para os mesmos efeitos dopaminérgicos no ATV e NAc (KRISHNAN; NESTLER, 2010). Todas as principais classes de drogas de abuso aparentam sinalizar uma recompensa, pelo menos em parte, por artificialmente aumentar a transmissão de dopamina especialmente no NAc, como, por exemplo, a cocaína que bloqueia o transportador de dopamina (NESTLER; CARLEZON, 2006).

No geral, parece que os efeitos de recompensa e condicionamento das drogas são predominantemente dirigidos por disparos fásicos que levam a aumentos grandes e transitórios de DA (KRISHNAN; NESTLER, 2010). Em contraste, as mudanças redutivas na função executiva que ocorrem no vício estão relacionadas com as mudanças nos neurônios dopaminérgicos de disparo tônico e resultam em níveis mais baixos, mas mais estáveis de DA

(WANAT et al., 2009). Isto, por sua vez, aponta para os receptores D1 (DRD1), que são receptores de baixa afinidade por DA que estimulam a sinalização AMP cíclico, estando envolvidos tanto em recompensa por intoxicação aguda, assim como no condicionamento, uma vez que estes estão associados com as altas concentrações DA necessária para estimular DRD1s. Em contraste, os receptores de dopamina D2 (DRD2), que inibem a sinalização AMP cíclico, são estimulados por neurônios dopaminérgicos de disparo fásico e tônico (VOLKOW et al., 2011b).

Foi sugerido que uma redução nos DRD2 está associada a comportamentos de dependência, independentemente de ser devido à alimentação (WANG, G. J. et al., 2001) ou às drogas, como visto em indivíduos com abuso de substâncias (HIETALA et al., 1994; VOLKOW et al., 1993; WANG, G. J. et al., 1997). Comer é um comportamento altamente reforçador que não só fornece os nutrientes necessários para a sobrevivência, mas que também induz sentimentos de gratificação e prazer. A alimentação aumenta a concentração de DA extracelular no NAc (BASSAREO; DI CHIARA, 1999), que é um efeito que pode contribuir para reforçar o efeito de euforia, bem como o de drogas de abuso.

Tem sido postulado que os transtornos compulsivos, como dependência em drogas, jogos e obesidade refletem uma "síndrome de deficiência de recompensa", que se acredita ser devido, em parte, a uma redução de DRD2s (BLUM et al., 1996). Assim, drogas de abuso são consumidas por seres humanos ou auto-administradas em animais de laboratório porque eles são inerentemente gratificantes, um efeito que é mediado através de suas propriedades que aumentam DA no sistema mesolímbico (WISE, 2009). No entanto, no caso da dependência, estudos de imagem revelaram que o distúrbio afeta não apenas o circuito dopaminérgico de recompensa, mas também outras vias dopaminérgicas envolvidas na modulação de condicionamento, hábitos, motivação e funções executivas (controle inibitório, a atribuição de relevância, e tomada de decisões), e que os déficits de DA também podem participar da maior reatividade ao estresse e perturbação da consciência interoceptiva associadas com a dependência (VOLKOW et al., 2011b).

### ***1.2.3 Recompensa X Depressão***

Dadas as características proeminentes da depressão, como anedonia e alterações do apetite, o circuito da recompensa tem se tornado um importante foco da atenção para estudos moleculares e eletrofisiológicos envolvendo este transtorno (KRISHNAN; NESTLER, 2010). Em roedores, a administração de antidepressivos em longo prazo reduz as



taxas de disparo de neurônios dopaminérgicos na ATV (DREMENCOV *et al.*, 2009). Em contraste, estressores psicossociais ativam disparos na ATV e aumentam os níveis de dopamina no NAc (ANSTROM *et al.*, 2009; KRISHNAN *et al.*, 2007; TIDEY; MICZEK, 1996), e isso pode representar uma estratégia positiva de enfrentamento para aumentar a motivação durante situações estressantes (NESTLER; CARLEZON, 2006). Aumentos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no NAc induzidos pelo estresse podem mediar uma recompensa de aprendizagem patológica de tal forma que, após uma série de encontros sociais aversivos, o valor positivo gratificante de interação social é agora modificado ao ter uma valência negativa (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Assim, essa sinalização dopaminérgica mesolímbica aumentada pelo estresse pode explicar a eficácia relatada dos agentes dopaminérgicos como terapia adjuvante da depressão (NELSON; PAPAKOSTAS, 2009), e ao aumentar a sinalização dopaminérgica e de BDNF basal, esse modelo pode também explicar a significativa comorbidade de dependência de substâncias e transtornos depressivos (BRADY; SINHA, 2005; GRAHAM *et al.*, 2007).

Diferente da regulação da ingestão de drogas, que é predominantemente mediada pelos seus efeitos gratificantes, a regulação da ingestão de comida é modulada não apenas por seus efeitos de recompensa (fatores hedônicos), mas também por múltiplos fatores periféricos e centrais que captam os requerimentos de nutrientes no corpo necessárias para a sobrevivência (fatores homeostáticos). Curiosamente, há crescente evidência de que fatores homeostáticos (por exemplo, insulina, leptina, grelina) modulam a ingestão de alimentos, em parte, aumentando ou diminuindo a sensibilidade dos circuitos de recompensa do cérebro a estímulos alimentares (VOLKOW *et al.*, 2011a).

### **1.3 Leptina e Depressão**

Há agora evidências de que respostas dopaminérgicas estão ligadas recompensa de alimentos e que estes mecanismos também são susceptíveis de desempenhar um papel no consumo excessivo de alimentos e obesidade. É sabido que certos alimentos, especialmente aqueles ricos em açúcares e gorduras, são poderosamente gratificantes (LENOIR *et al.*, 2007). Alimentos altamente calóricos podem promover comer em excesso (ingestão desacoplada a necessidades energéticas) e acionar associações de aprendizado entre o estímulo e a recompensa (condicionamento).

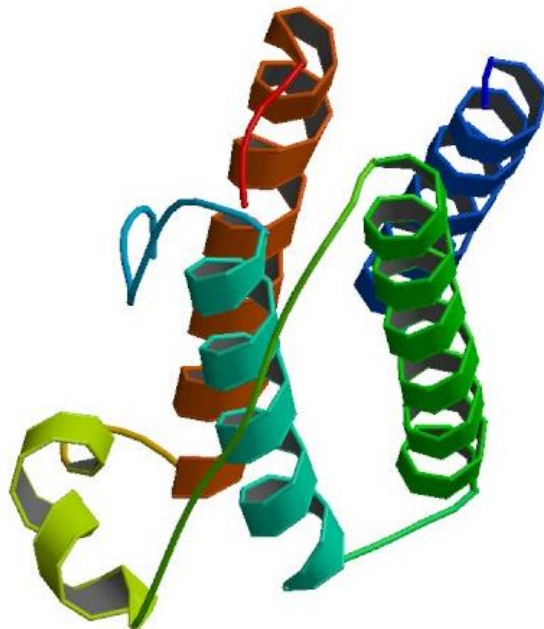
Em termos evolutivos, esta propriedade de alimentos palatáveis costumava ser vantajosa em ambientes onde as fontes de alimentos eram escassas ou não confiáveis, porque

garantiu que o alimento fosse comido quando disponível, permitindo que a energia fosse armazenada no corpo (como gordura) para uso futuro. Infelizmente, em sociedades como a nossa, onde o alimento é abundante e constantemente disponível, esta adaptação tornou-se uma suscetibilidade (VOLKOW *et al.*, 2011b).

As alterações de apetite e metabólicas associadas com a depressão variam desde hipofagia grave e anorexia até compulsão alimentar e obesidade. Um profundo conhecimento de tais fenômenos complexos exige o conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos da homeostase energética, que se refere a processos que mantem o equilíbrio entre a ingestão calórica e gasto energético. Isso é conseguido em grande parte pela ação de hormônios circulantes que transmitem informações sobre os níveis de energia periféricos para o cérebro (LUTTER; NESTLER, 2009). Um hormônio que tem recebido atenção é a leptina.

A leptina (figura 5) é um hormônio peptídico secretado predominantemente pelos adipócitos e é liberada em momentos de excesso nutricional. Apresenta um ritmo circadiano e seu pico de liberação ocorre durante a noite e nas primeiras horas da manhã, bem como sua meia-vida plasmática é de 30 minutos (SINHA *et al.*, 1996). Tal adipocina entra no cérebro através de um sistema transportador saturável (LU, 2007).

Figura 5 - Modelagem tridimensional da leptina humana



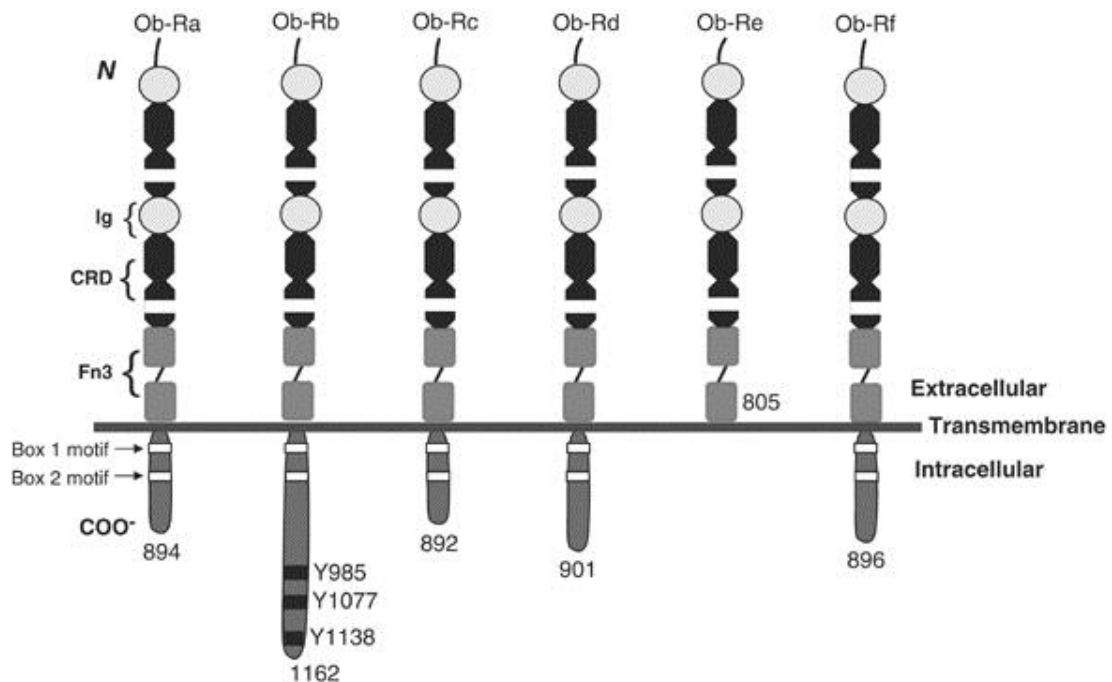
Um peptídeo de 167 aa com uma sequência sinal secretora amino-terminal de 21 aa. Para entrar na corrente sanguínea, há remoção do peptídeo sinal e secreção da forma circulante, um peptídeo de 146 aa com massa molecular de 14-16 kDa. Sua estrutura cristalina revela a existência de quatro  $\alpha$ -hélices. Fonte: PROLO *et al.*, 1998; arquivo do Banco de Dados de Proteína – PDB.

Foi inicialmente identificada como um hormônio anti-obesidade, atuando através de uma alça de retroalimentação negativa entre o tecido adiposo e o hipotálamo para controlar a homeostase energética (ELMQUIST *et al.*, 1998). A ação da leptina é feita a partir da ativação de receptores específicos presentes nos órgãos alvos, sendo o principal sítio de sua ação homeostática o núcleo arqueado do hipotálamo, onde exerce efeitos anorexígenos através de um sistema de neuropeptídios complexo.

O receptor da leptina é uma proteína transmembrana de um único domínio protéico pertencente à superfamília dos receptores tipo I das citocinas. O splicing alternativo do gene do receptor da leptina (*db*) gera seis isoformas que diferem no comprimento do domínio intracelular, mas que compartilham um sítio extracelular idêntico de ligação à leptina (figura 6) (AHIMA; OSEI, 2004).

A forma longa do receptor de leptina, ObRb, é expressa em diversas áreas cerebrais envolvidas na regulação do humor e do ânimo, como o hipocampo (ELMQUIST *et al.*, 1998; MERCER *et al.*, 1996). É interessante que receptores para leptina e receptores para outros peptídeos relacionados com alimentos são expressos em vários substratos límbicos relacionados com a depressão.

Figura 6 - Isoformas dos receptores da leptina



Todos compartilham domínios extracelulares de ligação idênticos mas diferem no C-terminal. Fonte: <http://www.nature.com/ijo/journal/v29/n10/images/0803025f2.jpg>

Tais fatos motivaram estudos sobre o potencial efeito antidepressivo da leptina. Em roedores, o estresse crônico diminui os níveis séricos de leptina. O trabalho de Lu *et al.* (2006) demonstrou que a leptina apresenta efeitos antidepressivos no teste do nado forçado, um dos paradigmas comportamentais mais amplamente aceitos para a avaliação de compostos com atividades antidepressivas. Esses pesquisadores também demonstraram que a injeção intrahipocampal de leptina produziu efeitos antidepressivos em ratos.

A administração sistêmica de leptina também induz neurogênese hipocampal in vivo e in vitro e aumenta o aprendizado espacial dependente do hipocampo (GARZA *et al.*, 2008). Além do mais a leptina tem efeitos neuroprotetores em neurônios CA1 do hipocampo (ZHANG; CHEN, 2008). Também foi visto que neurônios dopaminérgicos da ATV são inibidos pela leptina (FULTON *et al.*, 2006; HOMMEL *et al.*, 2006).

Diversas evidências sugerem o envolvimento da leptina na rede complexa de mediadores neuroquímicos relacionados à depressão. A leptina está diminuída no cérebro de indivíduos que cometeram suicídio (EIKELIS *et al.*, 2006) e no sangue de indivíduos que tentaram suicídio (ATMACA *et al.*, 2008). Pelo menos dois estudos demonstraram que os níveis séricos da leptina estão diminuídos na depressão quando comparados a controles (JOW *et al.*, 2006; KRAUS *et al.*, 2001). Outros estudos demonstraram o oposto (ANTONIJEVIC *et al.*, 1998; RUBIN *et al.*, 2002).

Embora os seres humanos e roedores obesos normalmente tenham níveis circulantes de leptina elevados em proporção com sua massa maior de gordura, as altas concentrações de leptina não reduzem a ingestão de alimentos, nem aumentam o gasto de energia. Esta situação paradoxal da obesidade tem sido chamada de "resistência à leptina" (YAMADA *et al.*, 2011). Muitos indivíduos obesos exibem uma hiperleptinemia associada com resistência à leptina central (ZIGMAN; ELMQUIST, 2003).

Além de déficits persistentes na interação social e anedonia, camundongos submetidos ao estresse crônico de subordinação social apresentam uma perda de peso inicial, seguido de uma fase hiperfágica prolongada, durante a qual eles rapidamente recuperam o seu peso corporal e, eventualmente, ganham mais peso do que animais controle ou resistentes ao estresse. Este fenômeno é pelo menos parcialmente mediado por níveis séricos reduzidos de leptina e pela resistência à leptina central (CHUANG *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que a leptina tem efeitos antidepressivos claros e que camundongos obesos mostram mais comportamentos depressivos, comparados com normais. Além disso, verificou-se que os níveis plasmáticos elevados de leptina induzem um estado antidepressivo e que o comportamento depressivo grave de camundongos geneticamente

obesos ob/ob que não produzem leptina foi melhorado por tratamento leptina, sem alterações no peso corporal. Estes achados sugerem que o desenvolvimento de depressão associada com obesidade é, pelo menos em parte, devido a um enfraquecimento da atividade da leptina no hipocampo (YAMADA *et al.*, 2011).

A compreensão dos mecanismos relacionados a ativação das vias de prazer a partir de sinais homeostáticos fornece numerosos alvos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de transtornos depressivos, particularmente em casos associados a alterações metabólicas significativas. Assim, pacientes com depressão e obesidade comórbidas (LUPPINO *et al.*, 2010) podem tirar proveito de terapias destinadas a aliviar a resistência à leptina central. Portanto, elucidar o impacto de tais terapias na depressão irá exigir uma profunda compreensão da anatomia e fisiologia da sinalização do receptor de leptina e de inúmeros outros peptídeos relacionados com a homeostase alimentar (KRISHNAN; NESTLER, 2010).

#### **1.4 Justificativa**

A Depressão é um transtorno neurológico grave, crônico, prevalente e associado ao risco aumentado de suicídio. Além disso, é um distúrbio de difícil diagnóstico e tratamento. Os antidepressivos existentes no mercado atualmente, apesar de eficazes, ainda apresentam uma baixa taxa de remissão dos sintomas, tendo consequências na vida dos pacientes em constante tratamento, sendo interessante, portanto, a descoberta de uma nova substância eficaz e que permita uma melhor qualidade de vida aos mesmos. Uma vez que a administração sistêmica de LPS se mostra um modelo eficaz de comportamento depressivo e a leptina apresenta efeitos antidepressivos amplos e comprovados em outros modelos de depressão, além de ser uma substância endógena, gerando poucos efeitos colaterais para os pacientes, é razoável hipotetizar que a Leptina apresentará bons resultados na prevenção de sintomas depressivos induzidos por LPS. Além disso, devido ao envolvimento dos circuitos dopaminérgicos de recompensa nos sintomas depressivos, também é possível induzir que a modulação da atividade antidepressiva da leptina acontece via sistema dopaminérgico. É importante ressaltar que ainda não havia publicado nenhum estudo que relacionasse o efeito da Leptina em um modelo de comportamento depressivo induzido por LPS.

## **2 PERGUNTAS DE PARTIDA**

1. A leptina apresenta atividade antidepressiva em modelo de comportamento tipo-depressivo induzido por LPS em camundongos?
2. Mecanismos dopaminérgicos estarão envolvidos na atividade antidepressiva da leptina?

### **3 HIPÓTESES**

1. A administração sistêmica de leptina apresenta atividade antidepressiva no modelo de comportamento tipo depressivo induzido por LPS.
2. Mecanismos dopaminérgicos estão diretamente relacionados à depressão.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar o papel da via dopaminérgica na atividade antidepressiva da Leptina em animais adultos submetidos ao modelo de depressão induzida por Lipopolissacarideo (LPS), utilizando antagonistas de receptores dopaminérgicos.

### **4.2 Objetivo específicos**

1. Observar as alterações comportamentais após administração de leptina em animais adultos submetidos ao modelo de depressão induzida por LPS utilizando os testes de nado forçado, campo aberto preferência por sacarose;
2. Verificar o efeito de drogas antagonistas dos receptores dopaminérgicos na atividade da leptina em animais submetidos ao modelo de depressão por LPS;
3. Dosar no hipocampo dos animais tratados os níveis de BDNF;
4. Dosar no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado os níveis da citocina IL-1 $\beta$  e de marcadores de estresse oxidativo, GSH e TBARS.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados aproximadamente 144 camundongos albinos adultos *Swiss* machos nascidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e mantidos em condições padrão de acondicionamento, ou seja, 23-25°C com ciclo claro/escuro de 12 h e alimentados com uma dieta padrão e água *ad libitum*. A manipulação dos animais foi realizada de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi realizado com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC, protocolo nº 38/2012.

### 5.2 Drogas

LPS, SCH23390 (antagonista de receptor D1), raclopride (antagonista do receptor D2/D3) e leptina recombinante de camundongo (Sigma, St. Louis, USA). Imipramina em forma de comprimido (Tofranil, fabricado pelo laboratório Novartis). Os demais reagentes foram de grau analítico.

### 5.3 Desenho Experimental

Figura 7 - Resumo do desenho experimental do trabalho



## 5.4 Tratamento

### 5.4.1 Protocolo 1 – Determinação dos efeitos antidepressivos da leptina no modelo de comportamento depressivo induzido por LPS

Para determinação dos efeitos antidepressivos da leptina os animais foram divididos em 5 grupos, cada um tratado via intraperitoneal com leptina (1,5 mg/kg), imipramina (10 mg/kg), LPS (0,5 mg/kg) ou salina, em 1 ou 2 administrações no período de 24 h antes da realização da atividade locomotora. A imipramina foi utilizada como antidepressivo tricíclico padrão, a fim de verificar a confiabilidade do teste.

### 5.4.2 Protocolo 2 – Determinação da participação de receptores dopaminérgicos (D1 e D2) no mecanismo da ação antidepressiva da leptina

Para a determinação do envolvimento do sistema dopaminérgico nos efeitos antidepressivos da leptina através do bloqueio sistêmico dos receptores D1 e D2, os animais foram separados em 4 diferentes grupos e pré-tratados antes da administração da leptina ou imipramina com as seguintes drogas: SCH23390 (15µg/kg, i.p.) e raclopride (0,4mg/kg, i.p.). Em seguida foram realizados os testes comportamentais.

Quadro 3 - Esquema dos grupos de tratamento dos protocolos 1 e 2

Grupo	Tratamento via intraperitoneal
1	Salina
2	LPS
3	Leptina
4	Leptina + LPS 30 min depois
5	Imipramina + LPS 30 min depois
6	SCH23390 + Leptina + LPS
7	Raclopride + Leptina + LPS
8	SCH23390 + Imipramina + LPS
9	Raclopride + Imipramina + LPS

## 5.5 Testes Comportamentais

### 5.5.1 *Teste do Campo Aberto* - Avaliação da atividade exploratória (ARCHER, 1973)

O campo aberto para camundongos é feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em 9 quadrantes iguais e utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (figura 8). Os principais parâmetros para observação são: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de autolimpeza (grooming), número de levantamentos (rearing), assim como o tempo em que permanece parado (imobilidade) e a sua defecação, como índice de emocionalidade, registrados durante um tempo de 4 minutos, após 1 minuto de habituação.

A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo. Os mesmos animais após determinação da atividade locomotora foram submetidos ao teste do nado forçado.

Figura 8 - Aparato utilizado para a realização do teste do campo aberto em camundongos



Fonte: Viviane Tomaz

### 5.5.2 *Teste do Nado Forçado* - Avaliação de sintomas depressivos (PORSOLT, 1979)

O procedimento experimental consiste em colocar os animais individualmente em cilindros plásticos de altura 35 cm e diâmetro 24 cm (figura 9), contendo 13,5 cm de água, por um período de 6 min, no qual é registrado o tempo total de imobilidade para cada animal, além da latência para apresentação de tal comportamento, a partir do segundo minuto.

Considera-se como imobilidade quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água.

Os antidepressivos aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais.

Figura 9 - Aparato utilizado para a realização do teste do nado forçado em camundongos



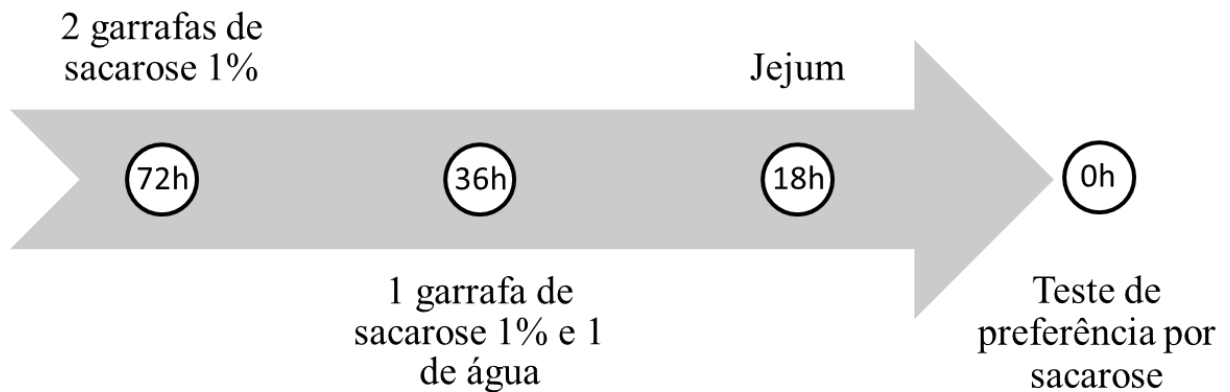
Fonte: Viviane Tomaz

### 5.5.3 Teste de Preferência Por Sacarose - Avaliação do comportamento anedônico (MAO *et al.*, 2014)

O teste foi realizado 24 horas após a administração de LPS para verificar anedonia induzida por LPS. O procedimento consistiu de um período de adaptação de 72 h antes do teste em que os camundongos foram treinados para se adaptar a solução de sacarose com dois frascos de uma solução de sacarose 1% (w / v) colocados em cada gaiola. 24 horas mais tarde, a solução de sacarose de uma garrafa foi substituída por água da torneira. Por último os animais foram privados de água e comida 18h antes do experimento (figura 10).

Para o teste os animais foram alojados em gaiolas individuais, com livre acesso a dois frascos, um com 100 ml de solução de sacarose 1% (w / v) e um com 100 ml de água. Depois de 1 h, os volumes de solução de sacarose consumida e água foram registrados e a preferência sacarose foi calculada como se segue: % do consumo de sacarose = consumo de sacarose / (água + o consumo de sacarose) x 100.

Figura 10 - Esquema do protocolo de adaptação para execução do teste de preferência por sacarose



## 5.6 Determinações Neuroquímicas

### 5.6.1 Dissecção das áreas cerebrais

Imediatamente após as determinações comportamentais os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, seus cérebros removidos e lavados em salina gelada. As regiões cerebrais hipocampo (HP), córtex pré-frontal (PF) e corpo estriado (CE) foram dissecadas, congeladas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas para os ensaios (prazo máximo de 6 meses de estocagem).

### 5.6.2 Avaliação dos níveis de GSH

O método enzimático utilizado foi originalmente descrito por Tietze (1969), e posteriormente modificado por Akerboom & Sies (1981). As amostras foram homogeneizadas em  $500\ \mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (TFK)  $20\ \text{mM}$  (pH 7,0). Do homogenato foram retirados  $10\ \mu\text{L}$  para a dosagem de proteína. A seguir, adicionamos  $100\ \mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 50% sobre o homogenato e a amostra, centrifugamos por 2 min a  $13.000\ \text{rpm}$ . Então, adicionamos  $500\ \mu\text{L}$  do sobrenadante com  $500\ \mu\text{L}$  de TFK  $1\ \text{M}$ , para assim promover a neutralização da amostra. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a  $412\ \text{nm}$ , contendo fosfato de potássio  $0,1\ \text{M}$  (pH 7,0),  $0,2\ \text{U/mL}$  de GR,  $0,1\ \text{mM}$  DTNB,  $1\ \text{mM}$  EDTA e  $0,2\ \text{mM}$  NADPH. A concentração de glutatona obtida através da realização de uma curva padrão com concentrações conhecidas de GSSG. Os valores são expressos em  $\text{ng/g}$  de tecido.

### 5.6.3 Avaliação dos níveis de TBARS

O método de Ohkawa *et al.* (1979) foi escolhido para determinar os níveis teciduais de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Alíquotas de homogenatos teciduais foram incubadas, a temperatura de 100°C por 45 minutos, em meio contendo 0,45% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1,4 M de ácido acético pH 3.5, e 0,6% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Após incubação o produto da reação foi extraído com butanol e lido em 540 nm. Para o cálculo dos níveis de TBARS utilizamos o coeficiente de extinção molar de  $1,56 \times 10^5$  M/cm. E os valores estão expressos em  $\mu\text{mol MDA/g}$  de tecido.

#### **5.6.4 Determinação de níveis de IL-1 $\beta$**

As áreas cerebrais foram homogeneizadas em vinte volumes de tampão PBS e centrifugadas (10.000 rpm, 5 min). A concentração das citocinas em amostras de 50  $\mu\text{L}$  foi determinada por ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante, e expressa em pg / g de tecido.

#### **5.6.5 Determinação de níveis de BDNF**

As áreas cerebrais foram homogeneizadas em oito volumes de tampão PBS com inibidores de protease (EMD Biosciences) e centrifugadas (10.000 rpm, 5 min). A concentração de BDNF em amostras de 50  $\mu\text{L}$  foi determinada por ELISA (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), seguindo as instruções do fabricante, e expressa em pg / g de tecido.

### **5.7 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPadPrism 5.0. Para comparação entre as médias foi feita uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os resultados foram comparados entre os grupos e com aqueles obtidos em animais controle. Em todos os casos as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM.

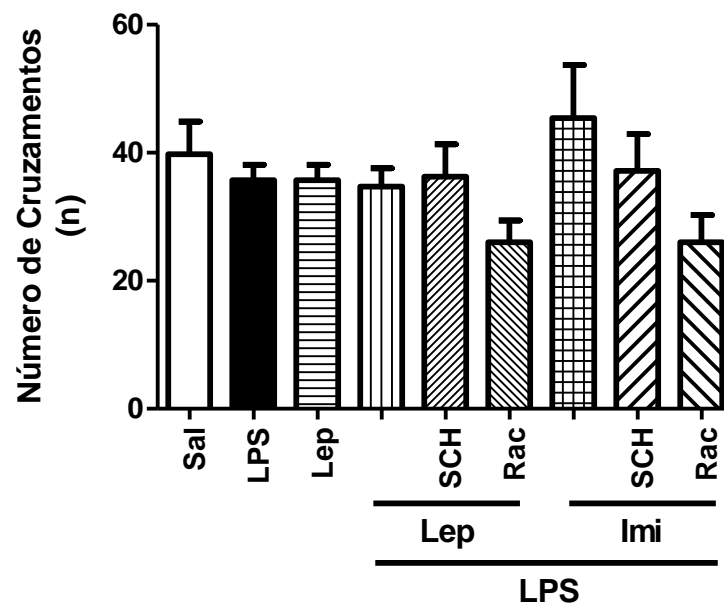
## 6 RESULTADOS

### 6.1 Avaliações Comportamentais

#### 6.1.1 Teste do Campo Aberto

Os valores da atividade locomotora avaliada pelo teste do campo aberto não sofreram alterações significativas [ $F(8,67) = 1,842, P < 0,05$ ] (Figura 11).

Figura 11 - Número de cruzamentos no teste do campo aberto

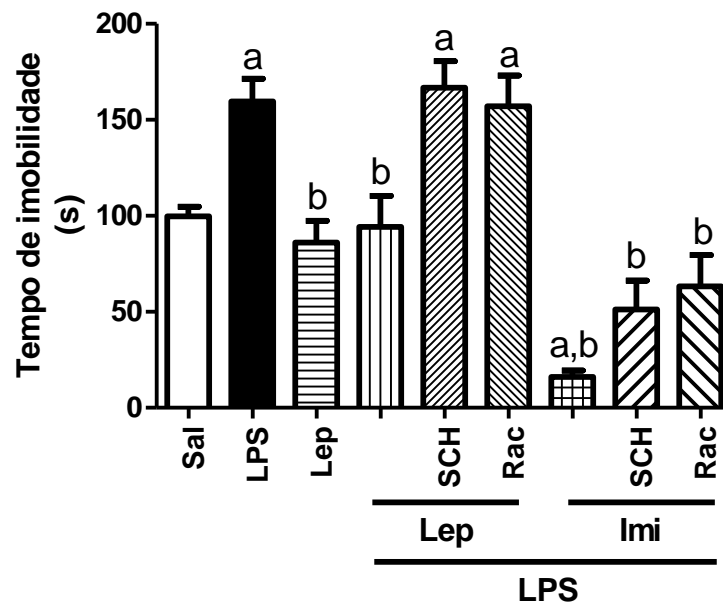


n = 5-10 animais para cada grupo, barras representam média  $\pm$  erro padrão das médias do número de travessias. Não houve diferença significativa entre os grupos, de acordo com ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*.

### 6.1.2 Teste do Nado Forçado

Quando comparado ao grupo controle, os animais que receberam apenas LPS aumentaram o tempo de imobilidade [ $F(8,73) = 16,29$ ,  $P < 0,01$ ]. O pré-tratamento com leptina, manteve o tempo de imobilidade semelhante ao controle. Os animais tratados com imipramina apresentaram redução do tempo de imobilidade comparado com controles [ $P < 0,001$ ]. O tratamento com os antagonistas dos receptores D1 e D2/D3 reverteu a atividade da leptina, apresentando valores semelhantes ao do LPS, enquanto quando tratados com imipramina não apresentaram diferença em relação ao controle (figura 12).

Figura 12 - Tempo de imobilidade no testado nado forçado



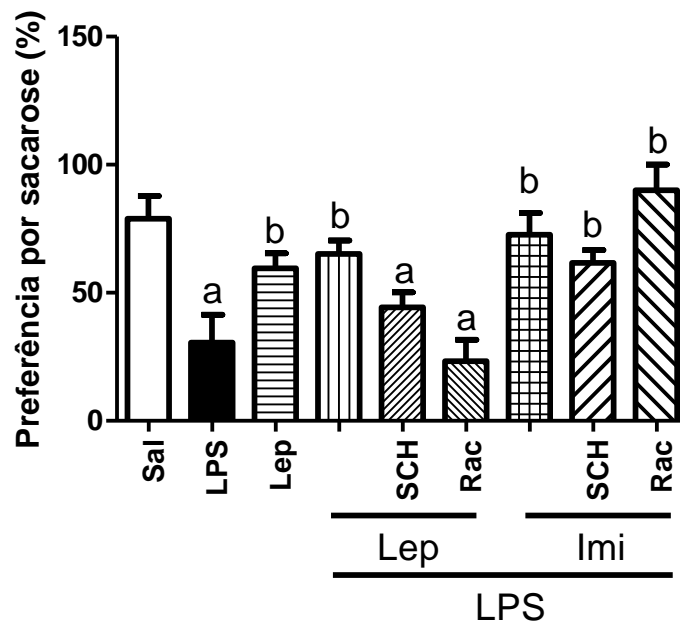
$n = 5-10$  para cada grupo, barras representam média  $\pm$  erro padrão das médias; a:  $p < 0,05$  versus Controle, b:  $p < 0,05$  versus LPS, de acordo com ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como um teste post hoc. Abreviações: Sal = Salina, Imi = imipramina, Lep = leptina, SCH = SCH23390, Rac = raclopride.



### 6.1.3 Teste da Preferência por Sacarose

No teste de preferência de sacarose, houve uma diminuição na preferência no grupo tratado com LPS quando comparada com solução salina [ $F(8,49) = 7,582, P < 0,05$ ]. O pré-tratamento com leptina, como também com imipramina, manteve o tempo de imobilidade semelhante ao controle. O tratamento com os antagonistas dos receptores D1 e D2/D3 reverteu a atividade da leptina, apresentando valores semelhantes ao do LPS, enquanto não modificaram a atividade da imipramina (Figura 13).

Figura 13 - Porcentagem do consumo de sacarose no teste de preferência por sacarose



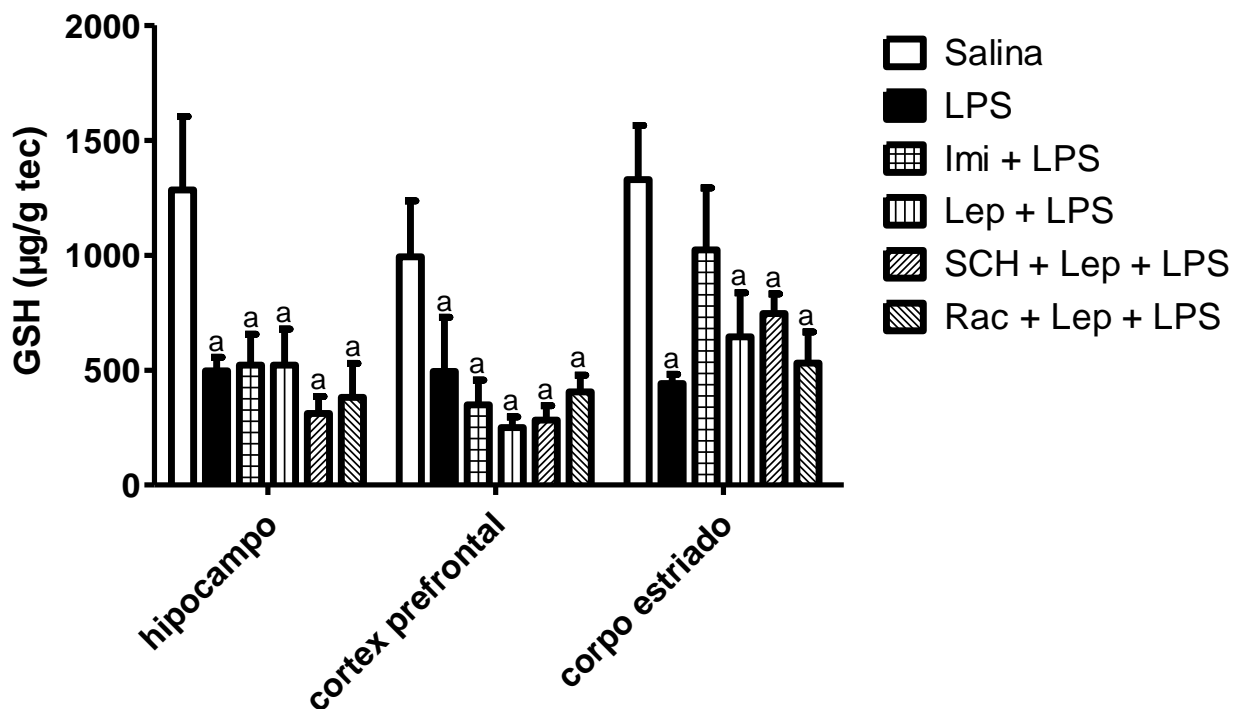
n = 5-6 animais para cada grupo, barras representam média  $\pm$  erro padrão das médias; a:  $p < 0,05$  versus Controle, b:  $p < 0,05$  versus LPS, de acordo com ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como um teste *post hoc*. Abreviações: Sal = Salina, Imi = imipramina, Lep = leptina, SCH = SCH23390, Rac = raclopride.

## 6.2 Avaliações Bioquímicas

### 6.2.1 Níveis de GSH nas áreas cerebrais

O conteúdo de GSH diminuiu nos animais que receberam apenas LPS quando comparado com os animais controles, no hipocampo [F(5,29) = 4,267, P < 0,05], córtex pré-frontal [F(5,34) = 3,227, P < 0,05] e corpo estriado [F(5,31) = 3,742, P < 0,05]. Todos os outros tratamentos apresentaram valores semelhantes aos do grupo tratado com LPS. (Figura 14).

Figura 14 - Níveis de Glutathiona Reduzida no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado

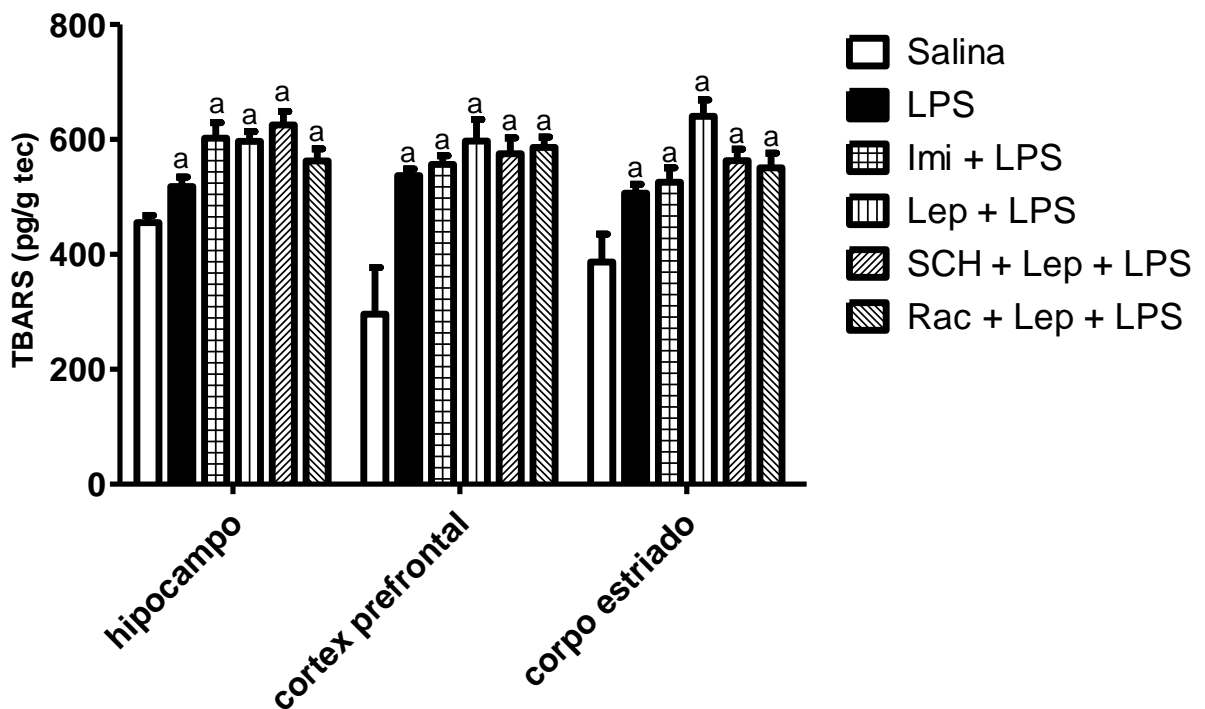


n = 5-6 animais para cada grupo, barras representam média  $\pm$  erro padrão das médias; a: p < 0,05 versus Controle, de acordo com ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como um teste *post hoc*. Abreviações: Imi = imipramina, Lep = leptina, SCH = SCH23390, Rac = raclopride.

### 6.2.2 Níveis de TBARS nas áreas cerebrais

Quando comparado ao grupo controle, todos os animais tratados aumentaram significativamente os níveis de TBARS, no hipocampo [ $F(5,33) = 9,731, P < 0,05$ ], córtex pré-frontal [ $F(5,35) = 8,251, P < 0,001$ ] e corpo estriado [ $F(5,34) = 8,439, P < 0,01$ ] (Figura 15).

Figura 15 - Níveis de Malonildialdeído no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado

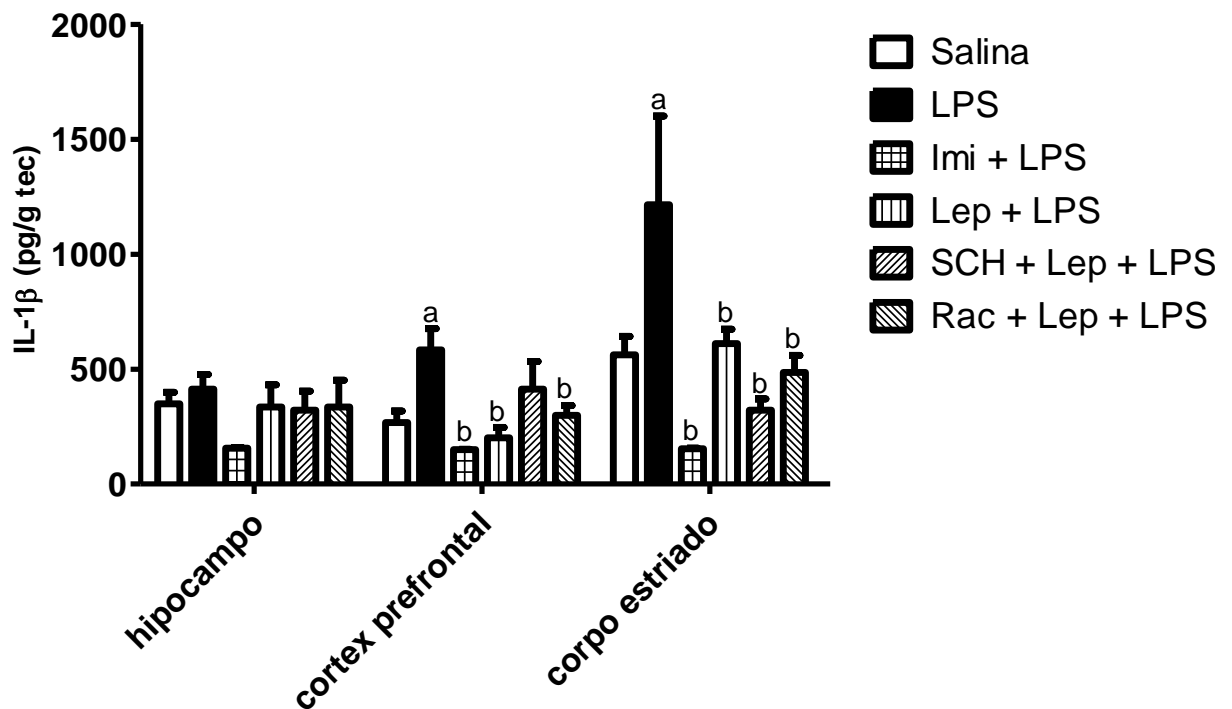


n = 5-6 animais para cada grupo, barras representam média  $\pm$  erro padrão das médias; a:  $p < 0,05$  versus Controle, de acordo com ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como um teste *post hoc*. Abreviações: Imi = imipramina, Lep = leptina, SCH = SCH23390, Rac = raclopride.

### 6.2.3 Níveis de IL-1 $\beta$ nas áreas cerebrais

Foi detectado que o LPS aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  quando comparados ao grupo controle no córtex pré-frontal [F(5,36) = 5,743, P < 0,05] e no corpo estriado [F(5,35) = 6,498, P < 0,01]. Os tratamentos com imipramina [P < 0,001] e leptina [P < 0,01] foram capazes de restaurar os níveis de IL-1 $\beta$  nessas áreas. Não foi observado efeito do pré-tratamento com antagonistas de receptores dopaminérgicos. O hipocampo não apresentou diferença significativa entre os diferentes tratamentos [F(5,35) = 1,715, P < 0,05] (Figura 16).

Figura 16 - Níveis da citocina IL-1 $\beta$  no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado

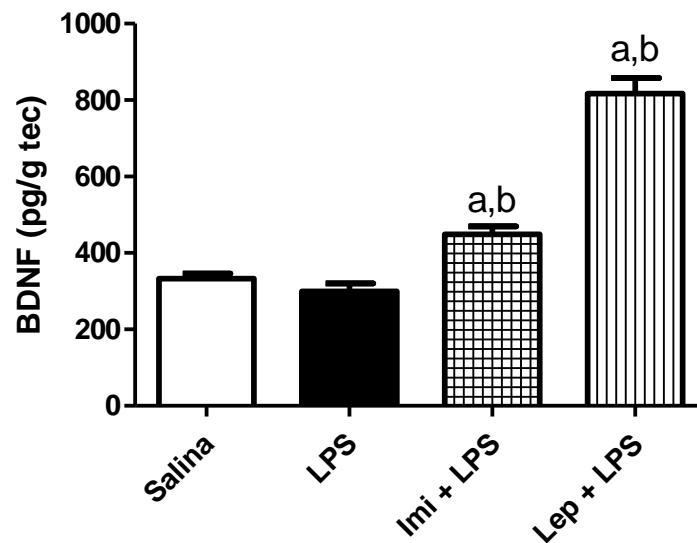


n = 5-8 animais para cada grupo, barras representam média  $\pm$  erro padrão das médias; a: p < 0,05 versus Controle, b: p < 0,05 versus LPS, de acordo com ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como um teste *post hoc*. Abreviações: Imi = imipramina, Lep = leptina, SCH = SCH23390, Rac = raclopride.

### 6.2.4 Níveis de BDNF no hipocampo

O pré-tratamento com Leptina aumentou os níveis de BDNF quando comparados com os animais tratados com salina e com LPS [ $F(3,22) = 85,62$ ,  $P < 0,001$ ], semelhante aos valores do tratamento com Imipramina [ $P < 0,01$ ] (Figura 17).

Figura 17 - Níveis de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro no hipocampo



n = 5-6 animais para cada grupo, barras representam média  $\pm$  erro padrão das médias; a:  $p < 0,05$  versus Controle, b:  $p < 0,05$  versus LPS, de acordo com ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls como um teste *post hoc*. Abreviações: Imi = imipramina, Lep = leptina.

## 7 DISCUSSÃO

Já foi demonstrado na literatura que a administração de leptina produz efeitos antidepressivos, em ratos e camundongos (GARZA *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2006; YAMADA *et al.*, 2011). Além disso, verificou-se que a leptina estimula a neurogênese no hipocampo adulto, uma característica compartilhada por antidepressivos sob condições basais e estresse crônico, acompanhado pela melhora do humor (CZEH; LUCASSEN, 2007).

O presente estudo é o primeiro a demonstrar que a leptina foi capaz de impedir as alterações comportamentais induzidas por LPS, reconhecido como um modelo animal de comportamento tipo-depressivo putativo. Também foi evidenciado o papel dos receptores dopaminérgicos D1- e D2/D3-símile nessa atividade, além de um possível mecanismo anti-inflamatório envolvido.

No teste do nado forçado, os animais apresentam um comportamento de "desespero", como indicado pela imobilidade e tentativas de fuga, em particular, pela natação. Quando um animal é forçado a nadar em um cilindro de vidro cheio de água a partir do qual ele não pode escapar, ele eventualmente cessa a tentativa de fuga e torna-se imóvel. Assim, quanto maior for seu tempo de imobilidade indica um estado mais depressivo. O desespero induzido pelo estresse comportamental é considerado análogo à depressão em seres humanos (LUCKI, 1997). No grupo pré-tratado com leptina percebe-se a capacidade desta de evitar o aumento do tempo de imobilidade causado pelo LPS.

Lu *et al.* (2006) também demonstraram que a leptina apresenta efeitos antidepressivos no teste do nado forçado. Além disso, foi demonstrado que a infusão intra-hipocampal de leptina produziu efeitos antidepressivos em ratos semelhantes a sua administração sistêmica. Os efeitos comportamentais da leptina no nado forçado foram acompanhados pelo aumento da ativação neuronal em estruturas límbicas, particularmente no hipocampo.

É importante mencionar que em nossos resultados de 24 horas após a administração de LPS não foram observadas alterações na atividade locomotora espontânea. Este achado está de acordo com relatórios anteriores, como o de Tian *et al.* (2010) que investigou a atividade antidepressiva da genipina, uma aglicona do geniposídeo extraída do fruto de *Gardenia jasminoides* Ellis, utilizada na medicina tradicional chinesa. Além de detectar a ação antidepressiva através do teste do nado forçado, também não foi observada mudança na atividade locomotora no teste de campo aberto. Esse resultado só mostra que o teste do campo aberto é uma medida de emocionalidade e, assim sendo, não deve ser

influenciada por substâncias antidepressivas. Assim, estes dados sugerem que os animais estavam exibindo um comportamento tipo-depressivo, e não de doença.

Em relação ao papel dos receptores dopaminérgicos nessa ação antidepressiva no teste do nado forçado, os resultados indicam que pelo menos parte dela é via sistema dopaminérgico, percebido pelo impedimento do efeito antidepressivo da leptina quando houve pré-tratamento com os antagonistas de receptores D1 e D2. Contrário a isso, o pré-tratamento dos antagonistas não modificou atividade da imipramina em relação ao controle, indicando o sistema dopaminérgico não está envolvido na sua ação antidepressiva.

Os resultados da literatura sugerem que ambos os receptores D1 e D2 estão envolvidos na resposta comportamental ao nado forçado. Estudos demonstraram que a estimulação aguda do receptor de dopamina D1 resultou em um efeito antidepressivo, nos modelos animais de nado forçado e desamparo aprendido, enquanto o bloqueio deste receptor impediu o efeito de diferentes drogas antidepressivas em ambos os modelos (D'AQUILA *et al.*, 1994; GAMBARANA *et al.*, 1995). No trabalho de Borsini *et al.* (1988) a estimulação de DRD2s por agonistas exerce um efeito antidepressivo e o tratamento com o antagonista previne o efeito antidepressivo da desipramina. Em D'Aquila *et al.* (2010), a administração de SCH23390 na dose mais elevada e a de raclopride já na dose mais baixa aboliu o efeito da alopregnanolona no nado forçado.

No teste de preferência por sacarose, os animais são levados a escolher entre água e uma bebida de sacarose a 1%. Os animais em condições normais apresentam uma preferência por sacarose, ou seja, há um consumo maior da solução de sacarose em relação à água. Isso acontece, pelo menos em parte, porque o sabor doce ativa circuitos dopaminérgicos mesolímbicos de recompensa (BAKER *et al.*, 2003). Os animais sem preferência por sacarose apresentam um comportamento anedônico, análogo à anedonia, um sintoma comumente presente na depressão em seres humanos. No grupo pré-tratado com leptina há uma melhora da preferência por sacarose, reduzida pelo tratamento com LPS.

O papel dos receptores dopaminérgicos no teste de preferência por sacarose fica claro devido ao envolvimento do sistema dopaminérgico de recompensa no comportamento anedônico, comprovado aqui pelo impedimento do efeito antidepressivo da leptina quando houve pré-tratamento com os antagonistas de receptores D1 e D2. Contrário a isso, mas corroborando os resultados, o pré-tratamento com os antagonistas não modificou a ação antidepressiva da imipramina.

É bastante conhecido que os antagonistas DA suprimem a ingestão de soluções doces em ratos (MUSCAT; WILLNER, 1989). Várias descobertas sugerem que essa

supressão resulta, em parte, porque os antagonistas DA reduzem o valor da recompensa de sabor doce (SCHNEIDER, 1989), embora outras explicações tenham sido propostas para explicar os efeitos da droga sobre a ingestão e o reforço alimentar (BERRIDGE; ROBINSON, 1998; IKEMOTO; PANKSEPP, 1999). Além da redução da ingestão de soluções doces, antagonistas de DA podem também alterar a capacidade de soluções doces de reforçar a preferência por outros sabores (HSIAO; SMITH, 1995).

Semelhante aos resultados aqui encontrados em relação aos testes comportamentais, no trabalho de Mao *et al.* (2014), o tratamento crônico de piperina melhorou significativamente os déficits comportamentais de camundongos nos testes de preferência sacarose e nado forçado, em um modelo de estresse crônico, indicando assim sua atividade antidepressiva.

Os resultados da leptina em relação aos níveis de IL-1 $\beta$  apontam para um possível mecanismo anti-inflamatório mediando a sua atividade antidepressiva. A literatura mostra que a leptina desempenha um importante papel regulatório no sistema imune, além de suas já bem estabelecidas funções endócrinas. Os níveis de leptina aumentam rapidamente em condições inflamatórias agudas, tais como a colecistectomia, infecção aguda e sepses, particularmente favorecidas por citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , tendo assim um efeito pró-inflamatório (FERNANDEZ-RIEJOS *et al.*, 2010).

Vários estudos verificaram que a administração parentérica de LPS conduz a um aumento na leptina do plasma. Um papel protetor da leptina na remoção de patógenos é observado em camundongos deficientes de leptina *ob/ob*, que desenvolvem doença grave e morrem de infecção por *Klebsiella* mais rapidamente do que os camundongos selvagens. Os camundongos *ob/ob* também são altamente susceptíveis a letalidade induzida por LPS, que pode ser revertida através da administração de leptina. Os efeitos protetores da leptina nestes casos parece ocorrer através de uma modulação nas respostas de TNF- $\alpha$  e IL-6 após o contato com a endotoxina (BERNOTIENE *et al.*, 2006).

Além disso, tanto a estrutura de leptina e quanto seu receptor sugerem que a leptina pode ser classificada como uma citocina. Foi relatado que a leptina induzida por um desafio inflamatório está envolvido na anorexia e caquexia que acompanham as infecções. Isto é, a anorexia da infecção, o que é uma parte integral da resposta de fase aguda do hospedeiro, representa uma resposta benéfica à inflamação, permitindo que o indivíduo lute contra os desafios inflamatórios. Este papel imunomodulador da leptina durante a infecção ou inflamação, a torna propensa a atuar como um agente anti-inflamatório nas inflamações gastrintestinais (BRZOZOWSKI *et al.*, 2001).



A leptina também teve um efeito anti-inflamatório, num modelo experimental de colite aguda por meio de um mecanismo dependente de neutrófilos que depende do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, verificado através do fato que a leptina exógena, bem como o stress psicológico agudo, alivia a inflamação do cólon induzida por ácido acético (CAKIR *et al.*, 2004). Além disso, a leptina exógena possa exercer um papel anti-inflamatório no pâncreas exócrino, protegendo ratos contra pancreatite aguda mediada pela via do óxido nítrico (KONTUREK *et al.*, 2002).

Também, a leptina pode ser protetora contra o diabetes tipo 1, reduzindo insulite induzida por vírus. Quase 100% dos ratos, do tipo utilizados nesse estudo, recém-desmamados tratados com a combinação de um ativador do sistema imunológico inato, poly I:C, e do vírus de rato Kilham tornam-se diabéticos dentro de um prazo previsível. Além disso, em diversos contextos terapêuticos, o tratamento com leptina teve efeitos benéficos significativos na modulação da diabetes induzida por vírus. (KRUGER *et al.*, 2011). Outro estudo mostrou que a leptina endógena pode localmente proteger as articulações da forma mais grave de artrite reumatóide erosiva no ser humano (BOKAREWA *et al.*, 2003).

Evidências apontam para uma redução nos níveis de BDNF 24h após administração sistêmica de LPS (MAES *et al.*, 2011b). Em nossas condições experimentais, não foi possível observar essa redução nos níveis de BDNF hipocampais, entretanto o pré-tratamento tanto com imipramina quanto com leptina aumentou esse parâmetro quando comparado aos animais controles e tratados com LPS.

O aumento dos níveis de BDNF pela leptina, semelhante a ação da imipramina nesse modelo, condiz com os achados na literatura. Yamada *et al.* (2011) destacaram a influência da leptina nos níveis de BDNF. Para isso, foi avaliada a concentração no hipocampo de BDNF após a administração subcutânea de leptina em camundongos obesos e não obesos. A leptina aumentou significativamente o BDNF dos roedores não obesos. No entanto, nos ratos obesos, a leptina não afetou o BDNF. Quando o BDNF era injetado em ambos os grupos de camundongos, havia uma diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado (ação antidepressiva). Quando utilizado um bloqueador dos receptores de BDNF no hipocampo (K252a) concomitante ao uso de leptina, o tempo de imobilidade apresentou-se maior do que apenas o uso de leptina isoladamente. O K252a aboliu os efeitos antidepressivos da leptina. Esses resultados indicam que a leptina ativa o sistema BDNF no hipocampo, que por sua vez evoca atividade antidepressiva em animais normais.

Por ser uma substância endógena, a leptina com sua ação antidepressiva estabelecida se mostra bastante promissora para o tratamento da depressão, visto que um dos

maiores problemas atualmente na terapia são os efeitos colaterais advindos do uso das principais drogas para depressão. Não apenas o estudo mais aprofundado da leptina trará benefícios para os próprios pacientes, mas também pode beneficiar as pesquisas sobre depressão, aumentando o conhecimento no assunto e, entendendo melhor o mecanismo de sua ação antidepressiva, talvez seja possível compreender o mecanismo que gera esse transtorno nos seres humanos.

## 7.1 Considerações Finais

Quadro 4 - Resumo dos Testes Comportamentais

TESTE	LPS	LEP	SCH + LEP	RAC + LEP	IMI	SCH + IMI	RAC + IMI
NADO FORÇADO	↑*	↓#	↑*	↑*	↓*#	↓#	↓#
CAMPO ABERTO	-	-	-	-	-	-	-
PREF. SACAROSE	↓*	↑#	↓*	↓*	↑#	↑#	↑#

\* em relação ao controle, # em relação ao LPS

Quadro 5 - Resumo dos Testes Neuroquímicos

TESTE	LPS			IMI			LEP			SCH			RAC		
	PF	HP	CE	PF	HP	CE	PF	HP	CE	PF	HP	CE	PF	HP	CE
GSH	↓*	↓*	↓*	- #	- #	- #	- #	- #	- #	- #	- #	- #	- #	- #	- #
TBARS	↑*	↑*	↑*	- #	↑#	- #	- #	- #	↑#	- #	↑#	- #	- #	- #	- #
IL-1β	↑*	-	↑*	↓#	-	↓#	↓#	-	↓#	-	-	↓#	↓#	-	↓#
BDNF	-			↑*#			↑*#								

\* em relação ao controle, # em relação ao LPS

## **8 CONCLUSÃO**

Em conclusão, foi verificada a ação antidepressiva da leptina no modelo de comportamento depressivo induzido por LPS, bem como uma importante ação anti-inflamatória, mas seu mecanismo de ação no cérebro e a influência do sistema dopaminérgico nesta ação ainda são obstáculos a serem superados por meio da pesquisa no campo da neurofarmacologia, tal como a neurobiologia da depressão por completo. Esses esforços tem o intuito de melhorar os tratamentos de pacientes depressivos e conseqüentemente sua qualidade de vida, além de gerar importante colaboração para a comunidade científica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELAIRA, H. M.; REUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35 Suppl 2, p. S112-20, 2013. ISSN 1516-4446.
- AHIMA, R. S.; OSEI, S. Y. Leptin signaling. **Physiol Behav**, v. 81, n. 2, p. 223-41, Apr 2004. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159169> >.
- AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 373-82, 1981. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7329314> >.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 7, p. 499-511, Jul 2004. ISSN 1474-1733.
- ALAMO, C.; LOPEZ-MUNOZ, F. New antidepressant drugs: beyond monoaminergic mechanisms. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 14, p. 1559-62, 2009. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442173> >.
- ANSTROM, K. K.; MICZEK, K. A.; BUDYGIN, E. A. Increased phasic dopamine signaling in the mesolimbic pathway during social defeat in rats. **Neuroscience**, v. 161, n. 1, p. 3-12, Jun 16 2009. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19298844> >.
- ANTONIJEVIC, I. A. et al. Elevated nocturnal profiles of serum leptin in patients with depression. **J Psychiatr Res**, v. 32, n. 6, p. 403-10, Nov-Dec 1998. ISSN 0022-3956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9844957> >.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v. 21, n. 2, p. 205-35, May 1973. ISSN 0003-3472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4578750> >.
- ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition: DSM-IV-TR®**. American Psychiatric Association, 2000. ISBN 9780890420256. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=3SQrtpnHb9MC> >.
- ATMACA, M. et al. Serum leptin and cholesterol values in violent and non-violent suicide attempters. **Psychiatry Res**, v. 158, n. 1, p. 87-91, Feb 28 2008. ISSN 0165-1781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155776> >.
- BAKER, R. M. et al. Dopamine D1 and D2 antagonists reduce the acquisition and expression of flavor-preferences conditioned by fructose in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, n. 1, p. 55-65, Apr 2003. ISSN 0091-3057. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759113> >.
- BAN, E.; HAOUR, F.; LENSTRA, R. Brain interleukin 1 gene expression induced by peripheral lipopolysaccharide administration. **Cytokine**, v. 4, n. 1, p. 48-54, Jan 1992. ISSN 1043-4666.

BASSAREO, V.; DI CHIARA, G. Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. **Neuroscience**, v. 89, n. 3, p. 637-41, Mar 1999. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10199600> >.

BERNOTIENE, E.; PALMER, G.; GABAY, C. The role of leptin in innate and adaptive immune responses. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 5, p. 217, 2006. ISSN 1478-6354.

BERNSTEIN, A. L.; LEVENTHAL-ROCHON, J. L. Neurotoxicity related to the use of topical tretinoin (Retin-A). **Ann Intern Med**, v. 124, n. 2, p. 227-8, Jan 15 1996. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8533998> >.

BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 28, n. 3, p. 309-69, Dec 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858756> >.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-51, Feb 2006. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429123> >.

BILBO, S. D.; SCHWARZ, J. M. The immune system and developmental programming of brain and behavior. **Front Neuroendocrinol**, v. 33, n. 3, p. 267-86, Aug 2012. ISSN 0091-3022.

BILICI, M. et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **J Affect Disord**, v. 64, n. 1, p. 43-51, Apr 2001. ISSN 0165-0327.

BLANCHARD, R. J.; MCKITTRICK, C. R.; BLANCHARD, D. C. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. **Physiol Behav**, v. 73, n. 3, p. 261-71, Jun 2001. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438351> >.

BLUM, K. et al. The D2 dopamine receptor gene as a determinant of reward deficiency syndrome. **J R Soc Med**, v. 89, n. 7, p. 396-400, Jul 1996. ISSN 0141-0768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774539> >.

BOKAREWA, M. et al. Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 62, n. 10, p. 952-6, Oct 2003. ISSN 0003-4967.

BORSINI, F. et al. Stimulation of dopamine D-2 but not D-1 receptors reduces immobility time of rats in the forced swimming test: implication for antidepressant activity. **Eur J Pharmacol**, v. 148, n. 3, p. 301-7, Apr 13 1988. ISSN 0014-2999.

BRADY, K. T.; SINHA, R. Co-occurring mental and substance use disorders: the neurobiological effects of chronic stress. **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 8, p. 1483-93, Aug 2005. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16055769> >.

BRZOZOWSKI, T. et al. Brain-gut axis in gastroprotection by leptin and cholecystokinin against ischemia-reperfusion induced gastric lesions. **J Physiol Pharmacol**, v. 52, n. 4 Pt 1, p. 583-602, Dec 2001. ISSN 0867-5910.

CAKIR, B. et al. The anti-inflammatory effect of leptin on experimental colitis: involvement of endogenous glucocorticoids. **Peptides**, v. 25, n. 1, p. 95-104, Jan 2004. ISSN 0196-9781.

CALDJI, C.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biol Psychiatry**, v. 48, n. 12, p. 1164-74, Dec 15 2000. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137058> >.

CARLEZON, W. A., JR. et al. Regulation of cocaine reward by CREB. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2272-5, Dec 18 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9856954> >.

CARVALHO, A. F. et al. Augmentation strategies for treatment-resistant depression: a literature review. **J Clin Pharm Ther**, v. 32, n. 5, p. 415-28, Oct 2007. ISSN 0269-4727. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875106> >.

CHEN, J. et al. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 3, p. 301-11, Mar 2008. ISSN 0889-1591.

CHRISTIANSEN, D. et al. Differential effect of inhibiting MD-2 and CD14 on LPS- versus whole E. coli bacteria-induced cytokine responses in human blood. **Adv Exp Med Biol**, v. 946, p. 237-51, 2012. ISSN 0065-2598.

CHUANG, J. C. et al. A beta3-adrenergic-leptin-melanocortin circuit regulates behavioral and metabolic changes induced by chronic stress. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 11, p. 1075-82, Jun 1 2010. ISSN 1873-2402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060958> >.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 5, p. 238-45, May 2002. ISSN 0165-6147.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. Animal models of mood disorders: Recent developments. **Curr Opin Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 1-7, Jan 2007. ISSN 0951-7367.

CUSTODIO, C. S. et al. Time course of the effects of lipopolysaccharide on prepulse inhibition and brain nitrite content in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 713, n. 1-3, p. 31-8, Aug 5 2013. ISSN 1879-0712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23665499> >.

CZAPSKI, G. A.; GAJKOWSKA, B.; STROSZNAJDER, J. B. Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus. **Brain Res**, v. 1356, p. 85-94, Oct 14 2010. ISSN 0006-8993.

CZECH, B.; LUCASSEN, P. J. What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? **Eur Arch Psychiatry Clin**

**Neurosci**, v. 257, n. 5, p. 250-60, Aug 2007. ISSN 0940-1334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401728> >.

D'AQUILA, P. S. et al. Dopamine is involved in the antidepressant-like effect of allopregnanolone in the forced swimming test in female rats. **Behav Pharmacol**, v. 21, n. 1, p. 21-8, Feb 2010. ISSN 1473-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009921> >.

D'AQUILA, P. S. et al. Antidepressant-like effect of selective dopamine D1 receptor agonists in the behavioural despair animal model of depression. **Eur J Pharmacol**, v. 262, n. 1-2, p. 107-11, Sep 1 1994. ISSN 0014-2999.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 46-56, Jan 2008. ISSN 1471-003x.

DREMENCOV, E.; EL MANSARI, M.; BLIER, P. Effects of sustained serotonin reuptake inhibition on the firing of dopamine neurons in the rat ventral tegmental area. **J Psychiatry Neurosci**, v. 34, n. 3, p. 223-9, May 2009. ISSN 1488-2434. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448853> >.

DREMENCOV, E. et al. Hyperfunctionality of serotonin-2C receptor-mediated inhibition of accumbal dopamine release in an animal model of depression is reversed by antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 1, p. 34-42, Jan 2005. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15617725> >.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 3, p. 688-93, Jul 2005. ISSN 0091-3057.

DWIVEDI, Y. et al. Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. **J Neurochem**, v. 77, n. 3, p. 916-28, May 2001. ISSN 0022-3042.

EIKELIS, N. et al. Reduced brain leptin in patients with major depressive disorder and in suicide victims. **Mol Psychiatry**, v. 11, n. 9, p. 800-1, Sep 2006. ISSN 1359-4184. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16936761> >.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-51, May 2004. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093950> >.

ELMQUIST, J. K. et al. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 395, n. 4, p. 535-47, Jun 15 1998. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619505> >.

EVANS, D. L. et al. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. **Biol Psychiatry**, v. 58, n. 3, p. 175-89, Aug 1 2005. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16084838> >.



- FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, p. 59-65, 2004. ISSN 0102-8650. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502004000100010&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502004000100010&nrm=iso) >.
- FERNANDEZ-RIEJOS, P. et al. Role of leptin in the activation of immune cells. **Mediators Inflamm**, v. 2010, p. 568343, 2010. ISSN 0962-9351.
- FLECK, M. P. [Current subjects on depression]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 31 Suppl 1, p. S1-2, May 2009. ISSN 1516-4446. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19565146> >.
- FONTANA, A.; LITZ, B.; ROSENHECK, R. Impact of combat and sexual harassment on the severity of posttraumatic stress disorder among men and women peacekeepers in Somalia. **J Nerv Ment Dis**, v. 188, n. 3, p. 163-9, Mar 2000. ISSN 0022-3018. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749281> >.
- FRANCIS, D. et al. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. Moms, pups, stress, and glucocorticoid receptors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 794, p. 136-52, Sep 20 1996. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8853600> >.
- FULTON, S. et al. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. **Neuron**, v. 51, n. 6, p. 811-22, Sep 21 2006. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982425> >.
- GABILONDO, A. M.; MEANA, J. J.; GARCIA-SEVILLA, J. A. Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. **Brain Res**, v. 682, n. 1-2, p. 245-50, Jun 5 1995. ISSN 0006-8993.
- GAMBARANA, C. et al. Crucial role of D1 dopamine receptors in mediating the antidepressant effect of imipramine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 50, n. 2, p. 147-51, Feb 1995. ISSN 0091-3057.
- GAMBARANA, C. et al. A chronic stress that impairs reactivity in rats also decreases dopaminergic transmission in the nucleus accumbens: a microdialysis study. **J Neurochem**, v. 72, n. 5, p. 2039-46, May 1999. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217282> >.
- GARATTINI, S. Pharmacology of amineptine, an antidepressant agent acting on the dopaminergic system: a review. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 12 Suppl 3, p. S15-9, Jul 1997. ISSN 0268-1315. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9347388> >.
- GARRIOCK, H. A. et al. A genomewide association study of citalopram response in major depressive disorder. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 2, p. 133-8, Jan 15 2010. ISSN 1873-2402. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19846067> >.
- GARZA, J. C. et al. Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. **J Biol Chem**, v. 283, n. 26, p. 18238-47, Jun 27 2008. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367451> >.

\_\_\_\_\_. Leptin restores adult hippocampal neurogenesis in a chronic unpredictable stress model of depression and reverses glucocorticoid-induced inhibition of GSK-3beta/beta-catenin signaling. **Mol Psychiatry**, v. 17, n. 8, p. 790-808, Jul 2012. ISSN 1476-5578. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22182938> >.

GODBOUT, J. P. et al. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. **FASEB J**, v. 19, n. 10, p. 1329-31, Aug 2005. ISSN 0892-6638.

GRAHAM, D. L. et al. Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 8, p. 1029-37, Aug 2007. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618281> >.

GUO, W. et al. Additive effects of glyburide and antidepressants in the forced swimming test: evidence for the involvement of potassium channel blockade. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 4, p. 725-30, Aug 1996. ISSN 0091-3057.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 4, p. 561-4, Mar 19 2010. ISSN 0006-291x.

HARRIS, E. C.; BARRACLOUGH, B. Suicide as an outcome for mental disorders. A meta-analysis. **Br J Psychiatry**, v. 170, p. 205-28, Mar 1997. ISSN 0007-1250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9229027> >.

HIETALA, J. et al. Striatal D2 dopamine receptor binding characteristics in vivo in patients with alcohol dependence. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 116, n. 3, p. 285-90, Nov 1994. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7892418> >.

HITZEMANN, R. Animal models of psychiatric disorders and their relevance to alcoholism. **Alcohol Res Health**, v. 24, n. 3, p. 149-58, 2000. ISSN 1535-7414. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199284> >.

HOMMEL, J. D. et al. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. **Neuron**, v. 51, n. 6, p. 801-10, Sep 21 2006. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982424> >.

HSIAO, S.; SMITH, G. P. Raclopride reduces sucrose preference in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 50, n. 1, p. 121-5, Jan 1995. ISSN 0091-3057.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. D. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000500046&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500046&nrm=iso) >.

IKEMOTO, S.; PANKSEPP, J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 31, n. 1, p. 6-41, Dec 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611493> >.

ITO, R.; ROBBINS, T. W.; EVERITT, B. J. Differential control over cocaine-seeking behavior by nucleus accumbens core and shell. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 389-97, Apr 2004. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034590> >.

JOHNSON, J.; WEISSMAN, M. M.; KLERMAN, G. L. Service utilization and social morbidity associated with depressive symptoms in the community. **JAMA**, v. 267, n. 11, p. 1478-83, Mar 18 1992. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1538538> >.

JOW, G. M.; YANG, T. T.; CHEN, C. L. Leptin and cholesterol levels are low in major depressive disorder, but high in schizophrenia. **J Affect Disord**, v. 90, n. 1, p. 21-7, Jan 2006. ISSN 0165-0327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16324751> >.

KONTUREK, P. C. et al. Leptin modulates the inflammatory response in acute pancreatitis. **Digestion**, v. 65, n. 3, p. 149-60, 2002. ISSN 0012-2823.

KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, n. 4879, p. 715-23, Nov 4 1988. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903550> >.

KRAM, M. L. et al. Dopamine receptors and learned helplessness in the rat: an autoradiographic study. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, n. 4, p. 639-45, May 2002. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12188094> >.

KRAUS, T. et al. Low leptin levels but normal body mass indices in patients with depression or schizophrenia. **Neuroendocrinology**, v. 73, n. 4, p. 243-7, Apr 2001. ISSN 0028-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340338> >.

KRISHNAN, V. et al. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 391-404, Oct 19 2007. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956738> >.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct 16 2008. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923511> >.

\_\_\_\_\_. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. **Am J Psychiatry**, v. 167, n. 11, p. 1305-20, Nov 2010. ISSN 1535-7228. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843874> >.

KRUGER, A. J. et al. Leptin treatment confers clinical benefit at multiple stages of virally induced type 1 diabetes in BB rats. **Autoimmunity**, v. 44, n. 2, p. 137-48, Mar 2011. ISSN 0891-6934.

LADD, C. O. et al. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Prog Brain Res**, v. 122, p. 81-103, 2000. ISSN 0079-6123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737052> >.

- LAYE, S. et al. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 27, n. 1, p. 157-62, Nov 1994. ISSN 0169-328X.
- LENOIR, M. et al. Intense sweetness surpasses cocaine reward. **PLoS One**, v. 2, n. 8, p. e698, 2007. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17668074> >.
- LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 2, p. 764-785, 2// 2012. ISSN 0149-7634. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763411002120> >.
- LU, X. Y. The leptin hypothesis of depression: a potential link between mood disorders and obesity? **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 6, p. 648-52, Dec 2007. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032111> >.
- LU, X. Y. et al. Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1593-8, Jan 31 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423896> >.
- LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behav Pharmacol**, v. 8, n. 6-7, p. 523-32, Nov 1997. ISSN 0955-8810. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832966> >.
- LUPPINO, F. S. et al. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **Arch Gen Psychiatry**, v. 67, n. 3, p. 220-9, Mar 2010. ISSN 1538-3636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194822> >.
- LUTTER, M.; NESTLER, E. J. Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake. **J Nutr**, v. 139, n. 3, p. 629-32, Mar 2009. ISSN 1541-6100. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176746> >.
- MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676-92, Apr 29 2011a. ISSN 0278-5846.
- MAES, M. et al. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 702-21, Apr 29 2011b. ISSN 0278-5846.
- MAIER, S. F. et al. Stress, learned helplessness, and brain interleukin-1 beta. **Adv Exp Med Biol**, v. 461, p. 235-49, 1999. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10442176> >.

MANJI, H. K. et al. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. **Mol Psychiatry**, v. 5, n. 6, p. 578-93, Nov 2000. ISSN 1359-4184.

MAO, Q. Q. et al. Brain-derived neurotrophic factor signalling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. **Behav Brain Res**, v. 261, p. 140-5, Mar 15 2014. ISSN 0166-4328.

MARCUS, M. M. et al. Effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists on dopamine output in the shell and core subdivisions of the nucleus accumbens. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 4, p. 482-90, Mar 2001. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11249957> >.

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 1161-92, 2001. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520931> >.

MELLO, B. S. et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 10, p. 1521-9, Oct 2013. ISSN 1879-1379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835040> >.

MERCER, J. G. et al. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Lett**, v. 387, n. 2-3, p. 113-6, Jun 3 1996. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674530> >.

MOSLEN, M. T. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 366, p. 17-27, 1994. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598.

MUELLER, T. I. et al. Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of observational follow-up. **Am J Psychiatry**, v. 156, n. 7, p. 1000-6, Jul 1999. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401442> >.

MUSCAT, R.; WILLNER, P. Effects of dopamine receptor antagonists on sucrose consumption and preference. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 99, n. 1, p. 98-102, 1989. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2506610> >.

NAKAGAWA, Y. et al. Involvement of GABA(B) receptor systems in action of antidepressants: baclofen but not bicuculline attenuates the effects of antidepressants on the forced swim test in rats. **Brain Res**, v. 709, n. 2, p. 215-20, Feb 19 1996. ISSN 0006-8993.

NELSON, J. C.; PAPAKOSTAS, G. I. Atypical antipsychotic augmentation in major depressive disorder: a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. **Am J Psychiatry**, v. 166, n. 9, p. 980-91, Sep 2009. ISSN 1535-7228. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19687129> >.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, Mar 28 2002a. ISSN 0896-6273.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A., JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-9, Jun 15 2006. ISSN 0006-3223. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566899> >.

NESTLER, E. J. et al. Preclinical models: status of basic research in depression. **Biol Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 503-28, Sep 15 2002b. ISSN 0006-3223 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361666> >.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810> >.

PENNINX, B. W. et al. Minor and major depression and the risk of death in older persons. **Arch Gen Psychiatry**, v. 56, n. 10, p. 889-95, Oct 1999. ISSN 0003-990X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10530630> >.

PERERA, T. D. et al. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. **J Neurosci**, v. 27, n. 18, p. 4894-901, May 2 2007. ISSN 0270-6474.

PETRIE, R. X.; REID, I. C.; STEWART, C. A. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. **Pharmacol Ther**, v. 87, n. 1, p. 11-25, Jul 2000. ISSN 0163-7258.

PICCHINI, A. M. M., H. K.; GOULD, T. D. . GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, p. 419-428, 2004.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88-109, Jan 2008. ISSN 0893-133X.

PIZZAGALLI, D. A. et al. Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated individuals with major depressive disorder. **Am J Psychiatry**, v. 166, n. 6, p. 702-10, Jun 2009. ISSN 1535-7228. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19411368> >.

PORSOLT, R. D. Animal model of depression. **Biomedicine**, v. 30, n. 3, p. 139-40, Jul 1979. ISSN 0300-0893 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/573643> >.

\_\_\_\_\_. Animal models of depression: utility for transgenic research. **Rev Neurosci**, v. 11, n. 1, p. 53-8, 2000. ISSN 0334-1763. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716655> >.

POSTERNAK, M. A. et al. The naturalistic course of unipolar major depression in the absence of somatic therapy. **J Nerv Ment Dis**, v. 194, n. 5, p. 324-9, May 2006. ISSN 0022-3018. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699380> >.

QUEVEDO, J. **Pesquisa Translacional em Medicina**. 2009. Disponível em: < <http://periodicos.unesc.net/index.php/saude/article/view/143/148> >.

QUEVEDO, J.; SILVA, A. G. D. **Depressão: Teoria e Clínica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2013. 252 ISBN 9788565852340. Disponível em: < [http://books.google.com.br/books?id=RC3pQF\\_qqBwC](http://books.google.com.br/books?id=RC3pQF_qqBwC) >.

RACAGNI, G.; POPOLI, M. The pharmacological properties of antidepressants. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 25, n. 3, p. 117-31, May 2010. ISSN 1473-5857. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305568> >.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 635-700, 2002. ISSN 0066-4154

RUBIN, R. T.; RHODES, M. E.; CZAMBEL, R. K. Sexual diergism of baseline plasma leptin and leptin suppression by arginine vasopressin in major depressives and matched controls. **Psychiatry Res**, v. 113, n. 3, p. 255-68, Dec 30 2002. ISSN 0165-1781. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12559482> >.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, Nov 1965. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5319766> >.

SCHLAEPFER, T. E. et al. Deep brain stimulation to reward circuitry alleviates anhedonia in refractory major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 2, p. 368-77, Jan 2008. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429407> >.

SCHNEIDER, L. H. Orosensory self-stimulation by sucrose involves brain dopaminergic mechanisms. **Ann N Y Acad Sci**, v. 575, p. 307-19; discussion 319-20, 1989. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2699194> >.

SCHULTZ, W. Getting formal with dopamine and reward. **Neuron**, v. 36, n. 2, p. 241-63, Oct 10 2002. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12383780> >.

SCHWARZ, J. M.; BILBO, S. D. LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than Escherichia coli infection within the hippocampus of neonatal rats. **Neurosci Lett**, v. 497, n. 2, p. 110-5, Jun 22 2011. ISSN 0304-3940.

SEMMLER, A. et al. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 38, 2008. ISSN 1742-2094.

SHIMADA, M. et al. The involvement of O-antigen polysaccharide in lipopolysaccharide in macrophage activation. **Anticancer Res**, v. 32, n. 6, p. 2337-41, Jun 2012. ISSN 0250-7005.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J Exp Med**, v. 189, n. 11, p. 1777-82, Jun 7 1999. ISSN 0022-1007.

SHIRAYAMA, Y.; CHAKI, S. Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. **Curr Neuropharmacol**, v. 4, n. 4, p. 277-91, Oct 2006. ISSN 1570-159X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654637> >.

SINHA, M. K. et al. Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 228, n. 3, p. 733-8, Nov 21 1996. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

SMOSKI, M. J. et al. fMRI of alterations in reward selection, anticipation, and feedback in major depressive disorder. **J Affect Disord**, v. 118, n. 1-3, p. 69-78, Nov 2009. ISSN 1573-2517. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261334> >.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985. ISSN 0033-3158.

THASE, M. E.; ENTSUAH, A. R.; RUDOLPH, R. L. Remission rates during treatment with venlafaxine or selective serotonin reuptake inhibitors. **Br J Psychiatry**, v. 178, p. 234-41, Mar 2001. ISSN 0007-1250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230034> >.

TIAN, J. S. et al. Antidepressant-like effect of genipin in mice. **Neurosci Lett**, v. 479, n. 3, p. 236-9, Aug 2 2010. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561935> >.

TIDEY, J. W.; MICZEK, K. A. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. **Brain Res**, v. 721, n. 1-2, p. 140-9, May 20 1996. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8793094> >.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem**, v. 27, n. 3, p. 502-22, Mar 1969. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4388022> >.

TOMAZ, V. S. et al. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**, v. 268, p. 236-46, May 30 2014. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662848> >.

TRIVEDI, M. H. et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\*D: implications for clinical practice. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 28-40, Jan 2006. ISSN 0002-953X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16390886> >.

TSAI, H. C. et al. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1080-4, May 22 2009. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389999> >.

TSUBOI, H. et al. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. **J Affect Disord**, v. 91, n. 1, p. 63-70, Mar 2006. ISSN 0165-0327.



UHER, R. et al. Genetic predictors of response to antidepressants in the GENDEP project. **Pharmacogenomics J**, v. 9, n. 4, p. 225-33, Aug 2009. ISSN 1473-1150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365399> >.

VILLANO, L. A. B.; GNANHAY, A. L. Depressão: epidemiologia e abordagem em cuidados primários de saúde. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 10, n. 2, p. 10-20, 2011.

VOLKOW, N. D. et al. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. **Synapse**, v. 14, n. 2, p. 169-77, Jun 1993. ISSN 0887-4476 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8101394> >.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; BALER, R. D. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. **Trends Cogn Sci**, v. 15, n. 1, p. 37-46, Jan 2011a. ISSN 1879-307X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109477> >.

VOLKOW, N. D. et al. Food and Drug Reward: Overlapping Circuits in Human Obesity and Addiction. **Curr Top Behav Neurosci**, Oct 21 2011b. ISSN 1866-3370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016109> >.

WACKER, J.; DILLON, D. G.; PIZZAGALLI, D. A. The role of the nucleus accumbens and rostral anterior cingulate cortex in anhedonia: integration of resting EEG, fMRI, and volumetric techniques. **Neuroimage**, v. 46, n. 1, p. 327-37, May 15 2009. ISSN 1095-9572. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19457367> >.

WALLACE, D. L. et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 2, p. 200-9, Feb 2009. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151710> >.

WANG, G. J. et al. Dopamine D2 receptor availability in opiate-dependent subjects before and after naloxone-precipitated withdrawal. **Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 174-82, Feb 1997. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9015800> >.

WANG, G. J. et al. Brain dopamine and obesity. **Lancet**, v. 357, n. 9253, p. 354-7, Feb 3 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11210998> >.

WANG, J. et al. Chronic clomipramine treatment reverses core symptom of depression in subordinate tree shrews. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e80980, 2013. ISSN 1932-6203.

WARAICH, P. et al. Prevalence and incidence studies of mood disorders: a systematic review of the literature. **Can J Psychiatry**, v. 49, n. 2, p. 124-38, Feb 2004. ISSN 0706-7437. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15065747> >.

WILLNER, P. Cognitive functioning in depression: a review of theory and research. **Psychol Med**, v. 14, n. 4, p. 807-23, Nov 1984. ISSN 0033-2917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6545415> >.

\_\_\_\_\_. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 319-29, Dec 1997. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9452163> >.

WILLNER, P.; HALE, A. S.; ARGYROPOULOS, S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. **J Affect Disord**, v. 86, n. 1, p. 37-45, May 2005. ISSN 0165-0327.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 16, n. 4, p. 525-34, Winter 1992. ISSN 0149-7634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1480349> >.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, n. 10 Pt 1, p. 2331-71, Dec 2013. ISSN 1873-7528. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261405> >.

WISE, R. A. Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction. **Trends Neurosci**, v. 32, n. 10, p. 517-24, Oct 2009. ISSN 1878-108X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19758714> >.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 343-51, May 2001. ISSN 1471-003X.

YAMADA, N. et al. Impaired CNS leptin action is implicated in depression associated with obesity. **Endocrinology**, v. 152, n. 7, p. 2634-43, Jul 2011. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21521746> >.

ZANGEN, A. et al. Association between depressive behavior and absence of serotonin-dopamine interaction in the nucleus accumbens. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, n. 4, p. 434-9, Jun 2001. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441434> >.

ZHANG, F.; CHEN, J. Leptin protects hippocampal CA1 neurons against ischemic injury. **J Neurochem**, v. 107, n. 2, p. 578-87, Oct 2008. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752642> >.

ZIGMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K. Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3749-56, Sep 2003. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12933644> >.

ZUNG, W. W. Review of placebo-controlled trials with bupropion. **J Clin Psychiatry**, v. 44, n. 5 Pt 2, p. 104-14, May 1983. ISSN 0160-6689. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6406436> >.